



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DEFICIENCIA DE HIERRO, VITAMINA D Y REMODELADO ÓSEO EN MUJERES JÓVENES

Trabajo que para optar al grado de Doctora en Medicina
presenta

María del Pilar Zazo Lázaro

Licenciada en Medicina

Directores: Dra. Concepción de la Piedra Gordo

Dr. Manuel Fernández Guerrero

Dra. Concepción de la Piedra Gordo, Jefe Asociado del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz y **Dr. Manuel Fernández Guerrero**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe Asociado del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz,

INFORMAN

Que D^a **María del Pilar Zazo Lázaro**, licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: “**Deficiencia de Hierro, Vitamina D y Remodelado Óseo en mujeres jóvenes**”.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a 3 de Mayo de dos mil diecisiete.

Fdo. Dra. Dña. Concepción de la Piedra Gordo

Fdo. Dr. D. Manuel Fernández Guerrero

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento más profundo para la Dra. Concepción de la Piedra, directora de esta tesis, por su excepcional ayuda, sin ella este trabajo no se hubiera podido desarrollar. Gracias por transmitirme el entusiasmo por la investigación, por la paciencia, amabilidad y generosidad con la que me ha acogido en su grupo, por hacer sencillas las dificultades que parecen insuperables, por la constancia y capacidad de trabajo que contagia y por esas palabras de ánimo y cariño que siempre recibo cuando más lo necesito. Me siento muy afortunada de haber podido trabajar con ella. He aprendido grandes enseñanzas a nivel científico pero también a nivel personal y eso hace que sea un ejemplo a seguir.

Al Dr. Manuel Fernández Guerrero, co-director de esta tesis, que, con su sabiduría, su capacidad docente y su amabilidad, ha hecho posible que este trabajo se haga realidad.

A la Dra. Pilar Vaquero por haberme invitado a participar en este proyecto, y a todo su equipo, por haberme enriquecido con puntos de vista diversos según la formación académica de cada uno.

A Rosario Palomino, técnico del laboratorio de Unilabs-FJD, por enseñarme a manejar entre pipetas y tubos de ensayo.

A Ángel Alberquilla porque sin su ayuda y dedicación no hubiera podido acceder a información imprescindible para esta tesis.

A mi madre y a mi hermana por estar siempre a mi lado, por ser la base de mi vida, tanto profesional como personal. Desde pequeña me habéis educado en la constancia y el esfuerzo y... ¡fijaos dónde hemos llegado! Sin vosotras nunca habría sido posible. Vuestro gran corazón,

valentía y capacidad de superación hacen que seáis el ejemplo en el que fijarme para seguir adelante. Me siento muy orgullosa de teneros en mi vida.

A mi marido, porque somos “un equipo” y por compartir la filosofía de que si uno triunfa el otro también, a pesar de que conlleve sacrificios. Gracias por tus habilidades informáticas que me han resuelto muchas dificultades y por tu serenidad ante momentos de agobio. Pero, sobre todo, gracias por cambiarme la forma de ver la vida y hacerme más feliz día a día.

A Merche por ser mi cómplice a nivel personal y profesional. Se me agolpan en la cabeza tantas experiencias vividas: congresos, quedadas para entregar a tiempo algún artículo, reuniones en la residencia, guardias, también fiestas, comidas hablando sin parar, mil confidencias, tus consejos, tus palabras de aliento, esas miradas de apoyo sin necesidad de tener que hacer más... Gracias porque, sólo por ser como eres, haces que cualquier situación vivida a tu lado sea más agradable. Me siento muy afortunada de que seas mi “más mejor”.

A mis amigos del colegio, por estar ahí siempre, sin juzgar, por tomarnos con humor los obstáculos de la vida, por apoyarme cuando las fuerzas flaquean y por vuestro gran cariño.

A mis amigos de la universidad y la residencia, por hacer que todos estos años de duro estudio hayan sido más llevaderos.

Y, por último, a mis compañeros del centro de salud, por escuchar día tras día mis progresos en la tesis. Quiero dar unas gracias muy especiales a mi directora, por facilitarme todo lo que ha podido la realización de este trabajo. “Únicamente” puedo decir que es una profesional extraordinaria y un ser humano excepcional.

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Bioquímica Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz y en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto del Frío del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid.

Ha sido financiado por el Programa de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias: Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Proyecto AGL2009-11437) del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, y por el Grupo Leche Pascual.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

1,25(OH)₂D	1,25 dihidroxivitamina D
25(OH)D	1,25 dihidroxivitamina D
24,25(OH)₂D	24, 25 dihidroxivitamina D
CS	Centro de Salud
CTX	Telopéptido carboxiterminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I
DBP	Proteína fijadora de vitamina D (vitamin D binding protein)
DS	Desviación estándar
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FAT	Fosfatasa alcalina total
Grupo F	Grupo que ingirió la bebida fortificada en hierro
Grupo P	Grupo que ingirió la bebida placebo
Hb	Hemoglobina
ICTP	Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I
NS	No significatvo
NTX	Telopéptido aminoterminal del colágeno I
PTH	Hormona paratiroidea
PINP	Propéptido aminoterminal de procolágeno I
PICP	Propéptido carboxiterminal de procolágeno I
RDA	Recommended Dietary Allowance

RVD Receptor de la vitamina D

WHO/OMS World Health Organization/Organización Mundial de la
Salud

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFICIENCIA DE HIERRO Y ANEMIA FERROPÉNICA	2
1.2. CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO PARA LA SALUD.....	5
1.3. SUPLEMENTACIÓN CON HIERRO.....	6
1.4. LA VITAMINA D. SÍNTESIS Y METABOLITOS.....	8
1.5. CÓMO SE VALORA EL ESTADO DE LA VITAMINA D DEL ORGANISMO	11
1.6. PAPEL DE LA VITAMINA D. DE LLAVE DEL METABOLISMO FOSFO-CÁLCICO A REGULADOR FUNDAMENTAL DE GRAN PARTE DE PROCESOS METABÓLICOS.....	13
1.7. LA DEFICIENCIA DE VITAMINA D, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA	17
1.8. EL HUESO. REMODELADO ÓSEO.....	18
1.9. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO	22
1.10. PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA ERITROPOYESIS Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA CALIDAD ÓSEA.....	27
1.11. PAPEL DEL HIERRO EN LA PRODUCCIÓN DE VITAMINA D Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA CALIDAD ÓSEA	29
1.12. COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

3.1. ESTUDIO DEL NÚMERO DE PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA EN LA DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO DE LA COMUNIDAD DE MADRID	34
3.2. ESTUDIO EN MUJERES JÓVENES CON FERROPENIA.....	37
3.2.1. PACIENTES	37
3.2.2. DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	39
3.2.2.1. DETERMINACIÓN DEL HIERRO SÉRICO.....	40
3.2.2.2. HEMOGLOBINA SÉRICA	40
3.2.2.3. FERRITINA	41
3.2.2.4. TRANSFERRINA	41
3.2.2.5. ÍNDICE DE SATURACIÓN.....	41
3.2.3. ESTUDIO DE NIVELES DE HORMONAS IMPLICADOS EN METABOLISMO DEL CALCIO	42
3.2.3.1. 25 HIDROXIVITAMINA D.....	42
3.2.3.2. DETERMINACIÓN DE PTH EN SUERO	42
3.2.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO..	43
3.2.4.1. ISOENZIMA ÓSEA DE LA FOSFATASA ALCALINA (FAO)	43
3.2.5. TELOPÉPTIDO AMINOTERMINAL DEL COLÁGENO 1 (NTX)	43
3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1. NÚMERO DE MUJERES CON ANEMIA FERROPÉNICA ATENDIDAS EN LA DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO DE LA COMUNIDAD DE MADRID	47

4.2. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL HIERRO Y NIVELES DE 25 HIDROXIVITAMINA D DEL GRUPO TOTAL (n=124) Y DEL SUBGRUPO DE VOLUNTARIAS (n=41)	49
4.3. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA CONSUMIDA POR EL GRUPO TOTAL DE MUJERES.....	51
4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA CONSUMIDA POR EL SUBGRUPO DE MUJERES QUE VAN A INGERIR EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO O EL ZUMO PLACEBO.....	52
4.5. HIERRO Y PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL HIERRO EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO.....	54
4.6. NIVELES DE 25(OH)D EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO	56
4.7. NIVELES DE PTH EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO	59
4.8. NIVELES DE FOSFATASA ALCALINA ÓSEA EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO.....	61
4.9. NIVELES DE NTX EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO	63
5. DISCUSIÓN.....	65
6. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA.....	78
8. PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR	92

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFICIENCIA DE HIERRO Y ANEMIA FERROPÉNICA

La anemia es un trastorno en el cual el número de eritrocitos (y, por consiguiente, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre) es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo [1]. Las causas más frecuentes de este desequilibrio son las deficiencias nutricionales y la principal es la deficiencia de hierro, que puede originar anemia ferropénica. Se estima que el 50% de todas las anemias diagnosticadas son debidas a un déficit de este mineral y, por ello, se considera una causa importante de morbilidad y mortalidad [2].

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un total de 1500 a 1740 millones de personas en el mundo padecen anemia ferropénica, lo que supone el 24.8% de la población [3].

El origen de la deficiencia de hierro es multifactorial. Pueden influir en su desarrollo causas fisiológicas, nutricionales, patológicas y genéticas, que provoquen que la ingesta de hierro sea insuficiente o de mala calidad, o que las pérdidas de hierro excedan a su aporte [4]. Esto hace que determinados grupos de población presenten un mayor riesgo de desarrollar deficiencia de hierro y, por tanto, de padecer anemia ferropénica [2].

Se considera que los bebés prematuros o de bajo peso al nacer, niños en etapa preescolar y adolescentes presentan un riesgo elevado de presentar deficiencia de hierro y anemia ferropénica porque durante el crecimiento existe un aumento marcado de los requerimientos fisiológicos de dicho mineral [4]. La prevalencia de anemia en niños de 5 a 14 años es de 5.9% y 48.1% en países desarrollados y en vías de desarrollo respectivamente [5].

Las mujeres gestantes son otro grupo de riesgo de padecer anemia. Sólo un 20% de las mujeres que inician su embarazo conservan las reservas de hierro suficientes, ya que las menstruaciones o embarazos previos provocan frecuentemente que las hayan agotado. Debido a este motivo y al aumento de las demandas por los requerimientos del feto en desarrollo, se convierten en un grupo vulnerable. De hecho, el 50% de las embarazadas a nivel mundial son diagnosticadas de anemia ferropénica, (el 18% de las gestantes de los países industrializados y el 56% en los países en vías de desarrollo). Además las tasas de deficiencia de hierro se van incrementando en cada trimestre: un 9% en el primero, un 14% en el segundo y un 37% en el tercero. Por último, cabe destacar que se necesitan 2 años de consumo adecuado de hierro dietético para reemplazar el hierro perdido durante un embarazo [6].

En la población adulta, excluidas las mujeres embarazadas, la anemia es causada principalmente por las pérdidas sanguíneas. Por ello, las pérdidas menstruales hacen de las mujeres en edad fértil uno de los principales grupos de riesgo de padecer anemia ferropénica. La mayoría de este grupo de población presenta una concentración de ferritina sérica, marcador de los almacenes de hierro en el organismo, constantemente baja desde la adolescencia hasta la menopausia. A partir de ese momento, se observa un aumento gradual de sus niveles de ferritina. Con una esperanza de vida de 77 años, una media de edad de menarquia de

13 años y de menopausia de 50, las mujeres tienen pérdidas menstruales durante aproximadamente 37 años de su vida [7, 8, 9]. La pérdida media de hierro debido a la menstruación en mujeres europeas es de aproximadamente 0.45 mg/día, con pérdidas de 0.85, 1.35 y 1.75 mg/día en los percentiles 75, 90 y 95 respectivamente [10]. La prevalencia de anemia ferropénica en mujeres menstruantes es de 22.7% y 52% en países desarrollados y en vías de desarrollo respectivamente [5].

Si nos centramos en mujeres postmenopáusicas y en varones, las principales causas de anemia siguen siendo las pérdidas sanguíneas pero, en este caso, las más frecuentes son las gastrointestinales (hemorragias secundarias a fármacos (antiinflamatorios, ácido acetilsalicílico, corticoides), hernia de hiato, úlceras gástricas o duodenales, diverticulosis, hemorroides, neoplasia de colon,...). Generalmente son pérdidas ocultas crónicas cuyo diagnóstico se realiza, en muchas ocasiones, cuando la anemia ya es manifiesta [4].

La deficiencia de hierro también se puede asociar a patologías que provoquen malabsorción del mineral, tales como desórdenes de la mucosa gastrointestinal (enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colon irritable,...), o alteración de la secreción del ácido gástrico (incluyendo el uso de fármacos frecuentemente pautados como los inhibidores de la bomba de protones), y procedimientos quirúrgicos como el bypass gástrico o intestinal [11].

Otro grupo de riesgo son los atletas de alto rendimiento, en los que se ha descrito la anemia del deportista. Las pérdidas de hierro en este grupo de población pueden ser consecuencia de la hematuria, sudoración y sangrado gastrointestinal que se producen durante el ejercicio físico. También se ha demostrado que, durante el mismo, se origina una respuesta inflamatoria de fase aguda y aumentan los niveles de citoquinas. Esto hace que se incremente la producción hepática de

hepcidina, hormona reguladora de la absorción intestinal de hierro, lo cual conlleva una disminución de la absorción del mismo [12].

Otras posibles causas de anemia ferropénica son las dietas vegetarianas o con bajo contenido calórico, porque la ingesta de hierro puede verse comprometida en cuanto a cantidad o calidad (recordemos que el hierro presente en alimentos de origen vegetal como legumbres o cereales tiene baja biodisponibilidad) [13].

1.2. CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO PARA LA SALUD

La deficiencia de hierro leve o moderada, incluso sin anemia, tiene consecuencias adversas para la salud [5] tales como:

- Retraso en el crecimiento, lo que tiene repercusiones importantes en el desarrollo intrauterino fetal y en niños.
- Disminución del desarrollo psicomotor, función cognitiva y rendimiento intelectual. Los pacientes pueden presentar irritabilidad, labilidad emocional, disminución de la concentración y la memoria, cefalea, ataxia, parestesias y trastornos del sueño y la alimentación (es muy características la apetencia desmedida por sustancias poco habituales, como el hielo, por ejemplo). También se puede manifestar como un síndrome de piernas inquietas [14].
- Disminución del rendimiento físico, provocando debilidad y fatiga en el paciente.
- Alteraciones en el sistema inmunitario.
- Alteraciones en piel y mucosas tales como coloración azulada de la esclerótica, fragilidad de uñas y cabello,

glositis, atrofia de la mucosa gástrica y, en casos graves, producción de membranas esofágicas (síndrome de Plummer-Vinson) prácticamente desaparecido en la actualidad en nuestro medio [15, 16].

- En el embarazo, incremento del riesgo de parto pretérmino, bajo peso del recién nacido y aumento de la mortalidad perinatal de la madre y el hijo.

Además, la anemia ferropénica se asocia con disfunción gastrointestinal y patrones alterados endocrinológicos y metabólicos, incluyendo la producción de neurotransmisores y hormonas tiroideas, lo que conlleva alteraciones neurológicas, musculares, óseas y de termorregulación. Los mecanismos implicados se relacionan con el papel del hierro en numerosos sistemas enzimáticos y en la replicación y reparación del ADN [5, 17].

1.3. SUPLEMENTACIÓN CON HIERRO

La suplementación oral con sales ferrosas (sulfato ferroso y gluconato ferroso) para el tratamiento de anemia ferropénica ha sido ampliamente utilizada debido a su bajo coste y alta biodisponibilidad [18]. El tratamiento estándar de la anemia ferropénica es una dosis de sulfato ferroso de unos 100 mg de hierro al día. Se aconseja que se ingiera en ayunas porque su absorción aumenta pero, bajo esta condición, también aumenta la prevalencia de sus efectos adversos más frecuentes, que consisten en náuseas y dolor epigástrico. Si estos síntomas no desaparecen en pocos días, el médico debe reducir la dosis de hierro o recomendar que se consuma con los alimentos, aunque la absorción se puede llegar a disminuir hasta 2/3 del total [19]. Estos efectos

gastrointestinales son los que conllevan, en múltiples ocasiones, baja adherencia terapéutica, que es la mayor limitación a la que nos enfrentamos en este campo [18].

Entre las múltiples propuestas para superar este importante obstáculo, la fortificación de los alimentos es probablemente la solución más práctica, sostenible y rentable a largo plazo para prevenir la deficiencia de hierro y la anemia ferropénica. Su consumo formaría parte de la dieta habitual y así se mejoraría o mantendría un óptimo nivel de hierro en las poblaciones de riesgo [20, 21]. La mayor limitación que presenta es que el hierro es el mineral más difícil de adicionar a los alimentos, y eso hace que continúe siendo un reto para la industria [20]. Las investigaciones actuales se centran en encontrar un compuesto de hierro que no cause cambios sensoriales en el alimento al que se adicione y que se absorba de forma adecuada y con independencia de otros componentes de la dieta como fitatos, compuestos fenólicos o calcio. Además, se pretende conseguir a un coste plausible.

En los últimos años, el pirofosfato férrico es el compuesto que ha despertado más interés como fortificante de los alimentos. Las metodologías de microencapsulación, disminución del tamaño de la partícula y una correcta elección de la matriz a fortificar, han hecho de esta sal un elemento de elección para la fortificación de alimentos [21, 22, 23, 24, 25]. Además, se ha publicado el listado de sustancias autorizadas para la fortificación de los alimentos por la legislación europea (Commission Regulation (EU) No 1161/2011) en la que se incluye esta sal. El pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas se utiliza tanto en forma líquida como en forma liofilizada, para fortificar una serie de alimentos como leche, yogures, zumos, productos horneados y fórmulas infantiles.

De todo lo anterior se deduce que la fortificación de los alimentos con concentraciones de hierro en dosis fisiológicas, en comparación con la suplementación con dosis más altas, puede ser una estrategia útil para aumentar la ingesta de hierro en poblaciones con mayores requerimientos de este mineral siendo además la intervención más segura, según manifiesta la OMS [26].

1.4. LA VITAMINA D. SÍNTESIS Y METABOLITOS

A pesar del nombre, es más apropiado considerar a la vitamina D como una hormona esteroidea que como una vitamina en el sentido clásico del término. En primer lugar, su síntesis en la piel bajo la acción de la luz ultravioleta elimina su necesidad de aporte dietético, un principio clásico de definición de vitamina. Las transformaciones químicas a través de las cuales se producen los diferentes derivados de la vitamina D son del mismo tipo que las que caracterizan el metabolismo de otras hormonas esteroideas, como los glucocorticoides o los esteroides sexuales. La fina regulación de la síntesis de su metabolito más activo, la 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), es otro punto a favor de su naturaleza hormonal. Pero el argumento más importante es la presencia de órganos diana como el intestino, riñón y hueso, que contienen receptores citosólicos de alta afinidad, específicos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [27].

Al hablar de la vitamina D no podemos referirnos a un único compuesto sino a toda una familia de ellos que tienen carácter o actividad vitamínica, siendo los más importantes la vitamina D₂ o ergocalciferol (origen vegetal) y la vitamina D₃ o colecalciferol (origen animal) [28].

La vitamina D existente en el organismo puede proceder de dos fuentes, la sintetizada en la piel (aporte endógeno) y la obtenida a partir de la dieta (aporte exógeno) [28, 29].

En los animales superiores la vitamina D se puede producir en la piel a partir de su precursor, el 7-dehidrocolesterol, abundante en la misma como un intermediario en la biosíntesis del colesterol. Por acción de luz ultravioleta el 7-dehidrocolesterol pasa a previtamina D₃, que se encuentra en equilibrio tautomérico con el lumisterol y taquisterol, y que por acción puramente térmica se convierte en vitamina D₃.

La fotólisis del 7-dehidrocolesterol, que tiene lugar en la piel, aparentemente no está catalizada por enzimas o proteínas, y es idéntica a la reacción fotoquímica que sucede en disolventes orgánicos. Obviamente, esta reacción no requiere la presencia de ningún componente tisular.

Debido a sus características hidrofóbicas, la vitamina D circula en sangre unida a proteínas. Actualmente se sabe que la principal proteína de transporte de la vitamina D es una α -globulina de peso molecular 52.000, que se conoce como DBP ("vitamin D binding protein"). La DBP tiene una alta afinidad de unión a la vitamina D y a sus metabolitos, siendo su constante de afinidad mayor para la 25 hidroxivitamina D (25(OH)D) y 24,25 dihidroxivitamina D (24,25(OH)₂D) y menor para la 1,25(OH)₂D y vitamina D. Esta proteína, a diferencia de otras proteínas de transporte séricas, posee alta capacidad y afinidad por sus ligandos. Debido a su elevada concentración molar, comparada con la de los metabolitos de la vitamina D, la concentración libre, tanto de la vitamina D como de sus metabolitos es pequeña. Basándose en la ley de acción de masas más del 99% de todos los metabolitos de la vitamina D están ligados a la DBP [28].

Inicialmente se suponía que el hígado era el principal órgano de almacén de vitamina D. Sin embargo, actualmente está claro que el hígado no es un órgano que posea altas concentraciones de vitamina D, al menos

en los animales superiores, aunque esto sea cierto en el caso de algunos pescados y en los tiburones. El principal lugar de almacenamiento de la vitamina D son los depósitos grasos y no el hígado [30].

El aclaramiento de vitamina D del organismo depende en gran manera de la renovación de los depósitos grasos [31].

En la Figura 1 se resumen las vías de síntesis y metabolismo de la vitamina D. En el hígado, la vitamina D experimenta una primera hidroxilación en posición 25 para formar la 25(OH)D, el metabolito circulante en mayor proporción en sangre, con actividad biológica a dosis farmacológicas. La 25(OH)D formada no se almacena en el hígado sino que pasa a la sangre en concentraciones de 14 a 30 ng/ml y es transportada hasta el riñón ligada a la DBP. En el riñón, dependiendo de los niveles de calcio y fósforo del suero sufre una hidroxilación en posición 1 α , formándose la 1,25(OH)₂D, o bien se hidroxila en posición 24, formándose la 24,25(OH)₂D [31].

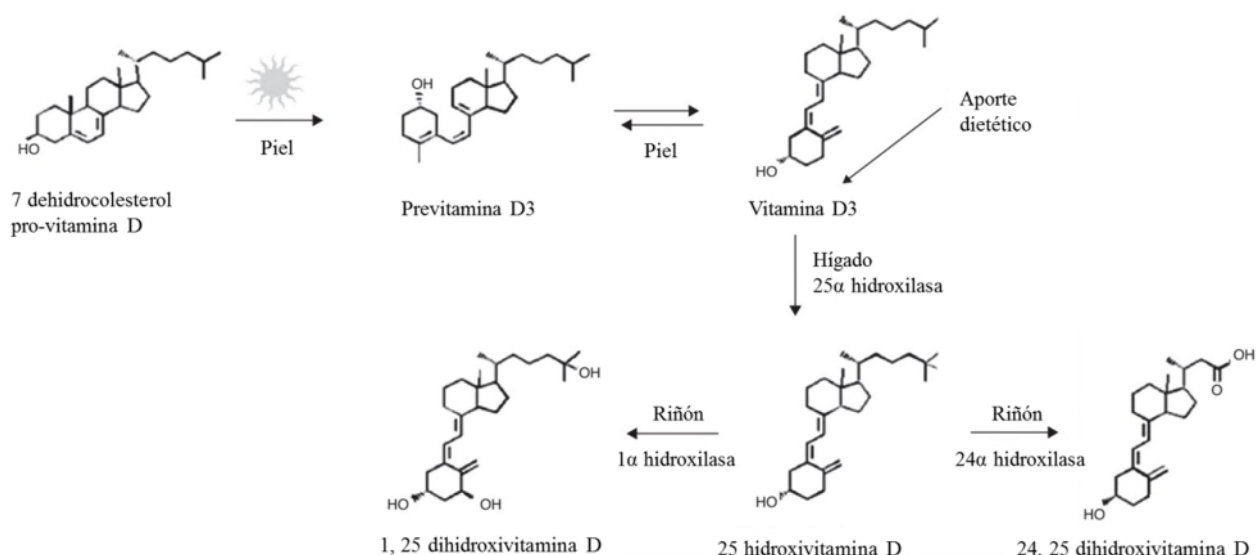


Figura 1. Vías de síntesis y metabolismo de la vitamina D.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es el metabolito más activo de la vitamina D. Interviene de modo fundamental en la absorción intestinal de calcio y fósforo. También actúa sobre los procesos de remodelado óseo. En este sentido, existen receptores para la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en la célula intestinal, en el riñón y en el hueso a nivel de osteoblastos. De hecho, anteriormente se pensaba que todas las acciones fisiológicas atribuidas a la vitamina D eran realizadas por este metabolito [33].

1.5. CÓMO SE VALORA EL ESTADO DE LA VITAMINA D DEL ORGANISMO

Existe acuerdo unánime en que el mejor parámetro para valorar el estado y reserva de vitamina D de una persona es el nivel sérico de $25(\text{OH})\text{D}$. Aunque en ocasiones los médicos hemos creído que los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ podrían reflejar mejor la realidad por ser el metabolito realmente activo, no es así en absoluto y los niveles de calcitriol no sólo no reflejan la riqueza de vitamina D del organismo, sino que pueden confundirnos bastante al respecto [34].

Cuando baja el nivel de vitamina D se produce un aumento de la secreción de hormona paratiroidea (PTH), que es un potente estimulador de la $1-\alpha$ -hidroxilasa renal, que transforma la $25(\text{OH})\text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$; es decir, el déficit de vitamina D lleva a un hiperparatiroidismo secundario y éste a un aumento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Esto demuestra que en condiciones de déficit ligero o moderado de vitamina D, las concentraciones séricas de calcitriol no están disminuidas, sino normales e incluso elevadas, por lo que no resultan útiles para valorar el contenido global de vitamina D. Sólo en circunstancias de deficiencia muy importante de vitamina D, cuando los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ son casi indetectables (≤ 10 nmoles/ml), los niveles de

1,25(OH)₂D están bajos, desencadenando en ese momento una malabsorción del calcio [35].

Ello se debe a que los niveles de calcitriol son muy bajos y están muy bien preservados, con una regulación muy fina para que falle en pocas ocasiones. De hecho, salvo en caso de insuficiencia renal o algún trastorno muy específico y muy poco frecuente del metabolismo del calcidiol, el 1,25(OH)₂D se mantiene en niveles adecuados y no es necesaria su determinación repetitiva.

Los niveles de 25(OH)D, sin embargo, se adecúan extraordinariamente a la ingesta de vitamina D y/o a la producción cutánea por acción de las radiaciones ultravioletas, al mismo tiempo que nos informan del estado de los depósitos de reserva.

El hígado, además, tiene una gran capacidad de hidroxilar (25-hidroxilación), siendo necesaria una insuficiencia hepática prácticamente total para que deje de efectuarse con normalidad esta función. Cuando se forma mucha cantidad de calcidiol, éste se deposita fundamentalmente en el tejido adiposo y músculo, para nuevamente acudir al torrente circulatorio en caso de necesidad.

Todo ello justifica, como se ha mencionado previamente, que la medida de los niveles séricos de 25(OH)D sea el parámetro más fiel y universalmente aceptado para valorar el estado de vitamina D del organismo [36].

De ello se deduce que mientras que la medición de 1,25(OH)₂D sólo sea necesaria en contadas ocasiones, especialmente si existe insuficiencia renal, los niveles séricos de 25(OH)D son una medida fiel del exceso, normalidad o déficit de vitamina D, lo que hace necesaria su determinación frecuente en la clínica diaria, a fin de obtener un mejor conocimiento del estado de suficiencia o deficiencia de nuestros pacientes y poder realizar el tratamiento más adecuado.

1.6. PAPEL DE LA VITAMINA D. DE LLAVE DEL METABOLISMO FOSFO-CÁLCICO A REGULADOR FUNDAMENTAL DE GRAN PARTE DE PROCESOS METABÓLICOS

Tradicionalmente, la acción básica de la vitamina D ha sido el mantenimiento del metabolismo fosfo-cálcico. Contener los niveles de calcio en el suero dentro de un rango estrecho es vital tanto para el funcionamiento normal del sistema nervioso como para el crecimiento óseo y mantenimiento de la densidad ósea. La vitamina D resulta esencial para la utilización eficiente del calcio por el organismo [38]. Las glándulas paratiroides captan los niveles de calcio en el suero y secretan PTH si los niveles de calcio disminuyen por debajo de lo normal (Figura 2). Incrementos en la PTH estimulan la actividad de la enzima 25-hidroxivitamina D3-1 α -hidroxilasa en el riñón, dando lugar a un aumento de los niveles de 1,25(OH)₂D. Estos niveles de 1,25(OH)₂D provocan la activación del receptor de la vitamina D (RVD) y cambios en la expresión de genes que normalizan el calcio en el suero; lo cual desencadena que se incremente la absorción intestinal de calcio dietético, que aumente la reabsorción de calcio filtrado por los riñones, y que se movilice el calcio del hueso cuando hay insuficiente calcio dietético para mantener los niveles séricos de calcio dentro del rango de la normalidad [38, 39, 40, 41].

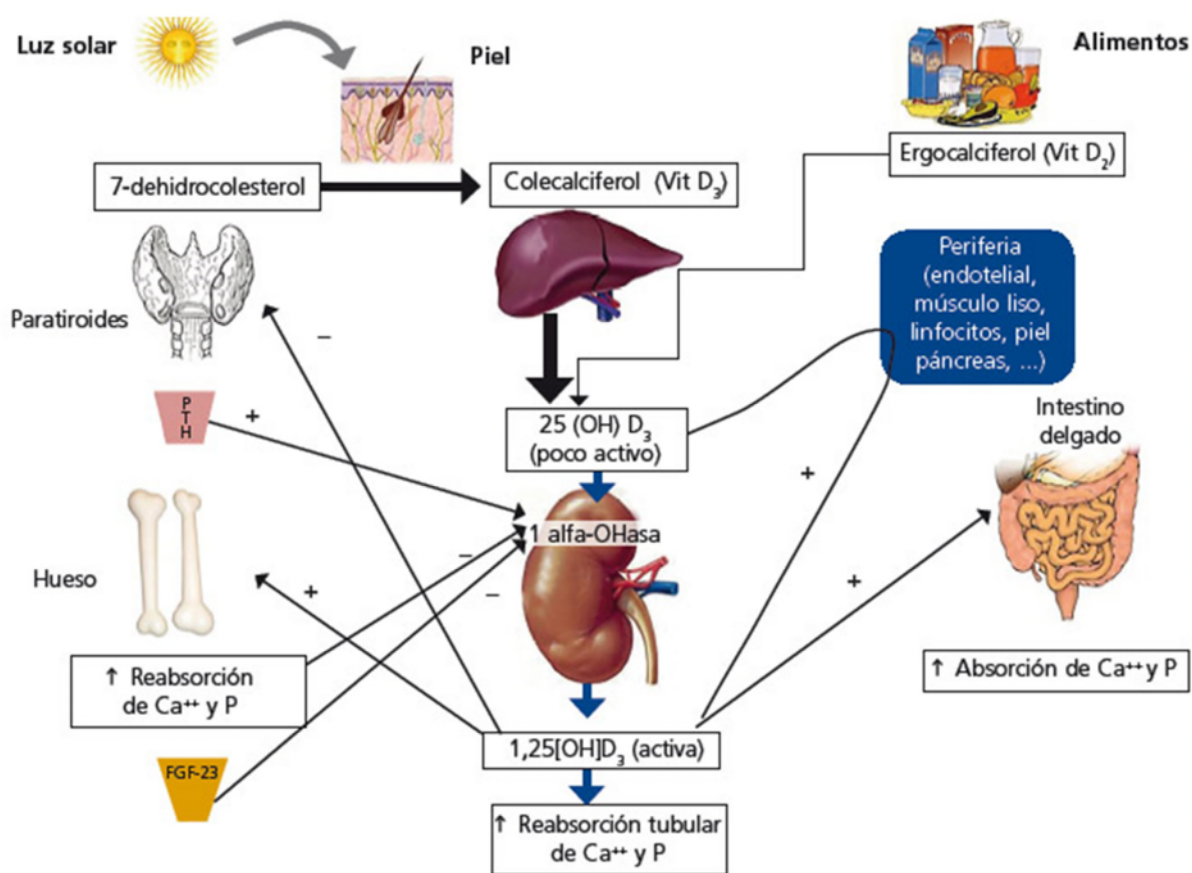


Figura 2. Vitamina D como reguladora del metabolismo fosfo-cálcico.

Como hemos constatado, la vitamina D es necesaria para una buena salud ósea y para el tratamiento de la osteoporosis. Centrándonos en este aspecto, es importante destacar que reduce el riesgo de fracturas mediante el aumento de la densidad mineral ósea pero, también, aumentando la fuerza muscular, consiguiendo así disminuir el riesgo de caídas. El metabolito activo de la vitamina D se une a sus receptores nucleares en el tejido muscular y esto influye en la síntesis de proteína de *novo* y afecta al crecimiento de la célula muscular, incrementando así la masa muscular. Este hecho está avalado por un estudio de 3 meses de seguimiento en los que la 1 α -hidroxivitamina D aumentó el número y

tamaño relativo de las fibras musculares tipo II de mujeres mayores [42, 43].

Además de las funciones de la vitamina D descritas hasta este momento, se han descubierto recientemente múltiples acciones extraesqueléticas de gran relevancia clínica que son atribuibles a la vitamina D. En cerebro, próstata, mama y en las células inmunológicas, entre otros, se encuentran RVD que se activan con la forma activa de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$). Además, algunos de estos tejidos y células expresan la enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa.

Directa o indirectamente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ controla más de 200 genes, incluyendo genes que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, y la angiogénesis. Disminuyen la proliferación celular de células tumorales y no tumorales e induce su diferenciación final. Una aplicación práctica de este uso de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y sus análogos activos es el tratamiento frente a la psoriasis [44].

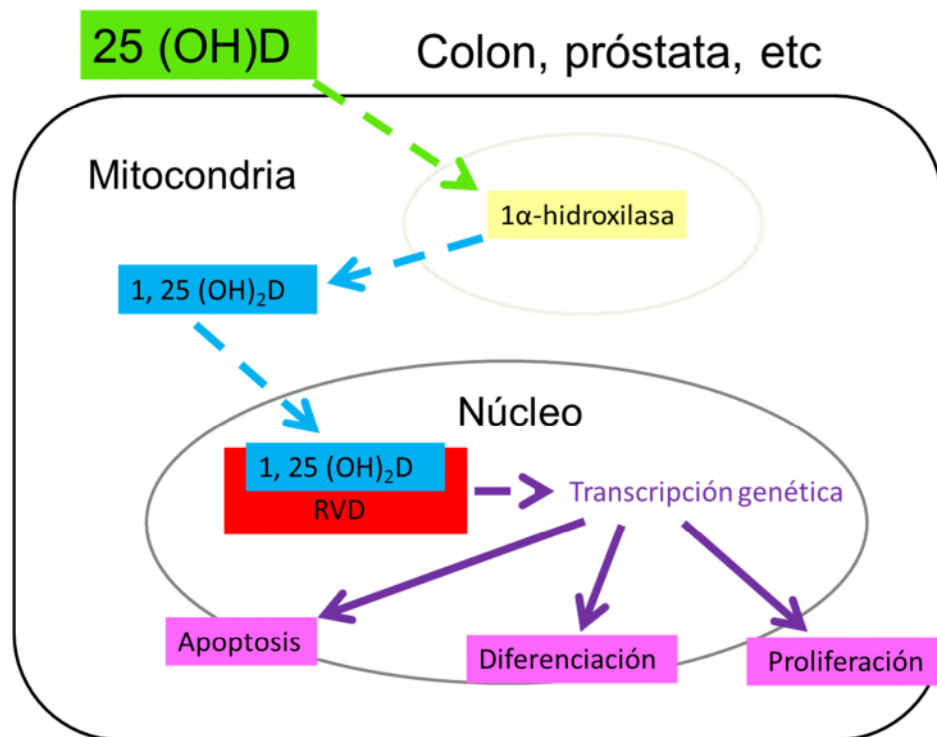


Figura 3. Acciones extraesqueléticas de la vitamina D.

1,25(OH)₂D es también un potente inmunomodulador. Monocitos y macrófagos expuestos a lipopolisacáridos o a *Mycobacterium tuberculosis* regulan el gen del RVD y de la 25-hidroxivitamina D-1α-hidroxilasa. Un aumento en la producción de 1,25(OH)₂D activa la síntesis de catelicidina, un péptido capaz de destruir el *M. tuberculosis* y otros agentes infecciosos. Cuando los niveles séricos de 25(OH)D son inferiores a 20 ng/ml, los monocitos y macrófagos son alertados para iniciar esa respuesta innata inmediata. Esto explica por qué los americanos de raza negra, frecuentemente deficientes de vitamina D, son más propensos a contraer tuberculosis que los americanos de raza blanca, y tienden a padecer formas más agresivas de la enfermedad. La 1,25(OH)₂D inhibe la síntesis de renina, aumenta la producción de insulina y aumenta la contractilidad cardíaca [44].

1.7. LA DEFICIENCIA DE VITAMINA D, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

La deficiencia de vitamina D es considerada un problema de salud pública [47]. Se estima que aproximadamente 1000 millones de personas en el mundo presentan niveles séricos de 25(OH)D menores de 30 ng/ml [44, 47]. En el caso específico de España, aunque sea un país con muchas horas de luz solar, se ha encontrado una prevalencia de deficiencia del 63% en mujeres adolescentes [48] y del 61% en adultos jóvenes [49]. Además, se ha descrito tras un estudio en mujeres con deficiencia de hierro que un 42% presentaba deficiencia y un 50% insuficiencia de vitamina D [50]. También hay estudios que aseguran que un tercio de la población española se encuentra en riesgo de padecer deficiencia de vitamina D [51].

Sin embargo, examinando investigaciones que analizan el estado de vitamina D en población sana a nivel mundial se concluye que es difícil conocer la prevalencia real de deficiencia de vitamina D en las poblaciones debido a las limitaciones de la información disponible. Por un lado, deben tomarse en cuenta criterios como la estación del año en la que se realiza el estudio (invierno/verano) y la variabilidad del método utilizado para la medición de los niveles de 25(OH)D (radioinmunoensayo (RIA), técnica de inmunoensayo (ELISA), quimioluminiscencia, cromatografía líquida de alto rendimiento o espectrometría de masas). Por otro lado, recientemente algunos autores cuestionan que los niveles séricos de 25(OH)D establecidos hasta ahora para determinar la deficiencia (< 20 ng/ml) e insuficiencia (entre 20 y 30 ng/ml) de la misma, realmente se correspondan con niveles que provoquen consecuencias negativas en la salud de los pacientes. Las recomendaciones dietéticas diarias actuales pretenden conseguir que la población adquiera unos niveles de vitamina D mínimos de 20 ng/ml, pero, dado que los valores de

los requerimientos de vitamina D siguen aproximadamente una distribución normal, estos autores sugieren que la mayor parte de la población puede tener sus necesidades cubiertas sin alcanzar niveles de vitamina D tan altos. Sin embargo, puesto que no se puede conocer actualmente las necesidades particulares de cada paciente, recomiendan mantener el límite de 20 ng/ml para la población general y valorar individualmente si elevar ese límite en pacientes con alto riesgo de que la hipovitaminosis D afecte a su salud (osteoporosis, osteomalacia, malabsorción, institucionalizados o ingesta de determinados medicamentos como anticonvulsivantes) [52].

1.8. EL HUESO. REMODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido dinámico sometido a un constante proceso de renovación (formación y resorción) denominado “remodelado”. Este fenómeno de renovación evita que el esqueleto acumule gran fatiga mecánica.

Se calcula que el 25% del hueso trabecular y el 3% del hueso cortical del adulto se renuevan anualmente [43] y que somos capaces de renovar por completo nuestro esqueleto en 10 años a través de este proceso.

El balance óseo es la diferencia entre el volumen de hueso reabsorbido y el de hueso formado; si la cantidad de hueso destruido y formado es equivalente, la masa ósea no varía (balance cero); si la destrucción supera a la formación, disminuye la masa ósea (balance negativo). A partir de los 40 años se instaura en el organismo una situación de balance negativo [53].

Para mantener la integridad ósea existen unas unidades especiales, denominadas “unidades de remodelación ósea”, encargadas de destruir el hueso viejo y reponerlo por hueso joven, resistente y elástico. Este proceso de remodelado óseo se lleva a cabo a partir de la actuación sucesiva y coordinada de osteoclastos y osteoblastos, que es imprescindible para mantener una correcta estructura ósea.

Al volumen de hueso renovado por unidad de tiempo se le denomina recambio óseo y aumenta con el déficit estrogénico y con el envejecimiento. Este aumento se produce, esencialmente, a expensas de un incremento del número de unidades de remodelado. Al aumentar el recambio, se intensifica la pérdida de masa ósea, como consecuencia del balance óseo negativo. En una situación de balance negativo, la actividad de cada unidad de remodelado determina una pérdida de hueso, ya que al aumentar el número de unidades, necesariamente aumenta la cantidad de hueso perdido [53].

Por otro lado, el aumento del recambio conlleva un aumento del espacio óseo en estado de remodelación, que es la cantidad de hueso que ha sido destruido por los osteoclastos y aún no ha sido restituida por los osteoblastos. El volumen de este espacio carente de hueso es mayor cuanto mayor es el número de unidades de remodelado activas.

Las fases del ciclo de remodelado se pueden visualizar en el esquema representado en la Figura 4.

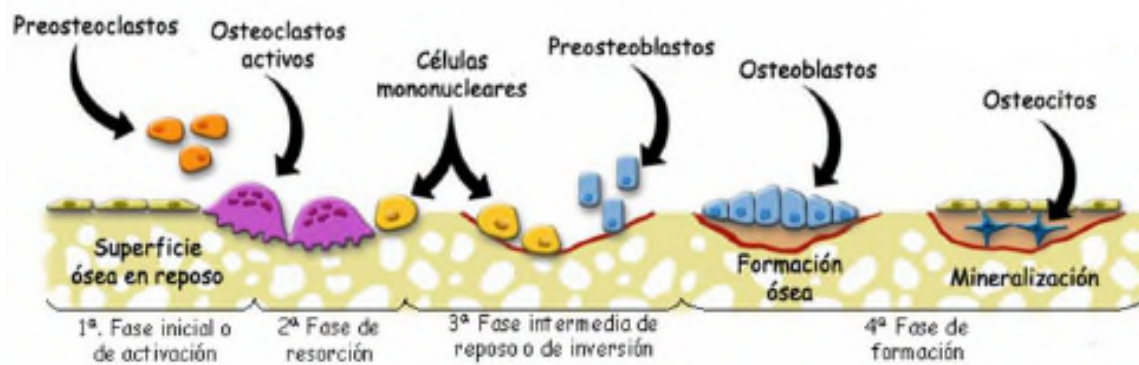


Figura 4. Etapas del remodelado óseo

1. Activación

Supone el paso del reposo a la actividad en una superficie ósea.

Las células de revestimiento son las que, a partir de la secreción de colagenasas, preparan la zona de remodelación y, mediante señales quimiotácticas, atraen a los preosteoclastos. Estos, tras proliferar y diferenciarse, se transforman en osteoclastos. Dicho proceso puede iniciarse por estímulos mecánicos o microfracturas, por cambios hormonales o por diferentes factores locales.

2. Resorción

Los osteoclastos activos se fijan sobre la superficie que va a ser remodelada y proceden a la lisis del hueso que precisa ser renovado. Secretan ácido clorhídrico y enzimas proteolíticas como la colagenasa o la catepsina K y los osteoclastos actúan produciendo una excavación en el hueso de forma y tamaño característicos. En el hueso trabecular esta cavidad se conoce como “laguna de Howship” y en el cortical como “cono de corte” o “cono penetrante”. Esta fase resortiva dura entre una y tres

semanas. Una vez completada esta fase, los macrófagos limpian la excavación y los osteoclastos desaparecen por un proceso de apoptosis.

Durante la degradación ósea, los osteoclastos producen fragmentos degradados de colágeno tipo I cuya cuantificación facilitará la monitorización del tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis y la valoración del riesgo de fracturas.

3. Inversión

Es un período de inactividad aparente que dura de una a dos semanas.

4. Formación

Se inicia con el reclutamiento de los precursores de los osteoblastos y la llegada de éstos a la cavidad. Una vez transformados en osteoblastos, comienzan a rellenar las cavidades previamente generadas con componentes orgánicos de la matriz, que se depositan en forma de laminillas concéntricas (hueso cortical) o paralelas (hueso trabecular). Entre el inicio del depósito de osteoide y la mineralización pasan alrededor de 10 días.

La fase de formación por parte de los osteoblastos dura unos 3 meses aproximadamente, período durante el cual se va a rellenar el hueso destruido con un hueso nuevo, flexible y resistente. Durante esta fase de formación ósea el procolágeno pasa a colágeno maduro gracias a las procolágeno peptidasas intersticiales.

1.9. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo nos permiten medir, a partir de sustancias presentes en el suero o en la orina, la actividad de los osteoblastos (células formadoras de hueso) o de los osteoclastos (células responsables del proceso de resorción).

De esta forma, se pueden cuantificar de algún modo las actividades formadora y resortiva del hueso y señalar la existencia de un alto grado de riesgo para el desarrollo posterior de fracturas [46], indicando la conveniencia de establecer un tratamiento anti-pérdida de hueso en un determinado paciente, por lo que resulta de extraordinario interés para los médicos.

Esta medición se puede realizar desde varios puntos de vista:

- Mediante la cuantificación sérica de una actividad enzimática propia del osteoblasto o del osteoclasto activo (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida tartrato resistente)
- Determinación de los productos específicos sintetizados por las células óseas (osteocalcina, propéptidos del procolágeno)
- Determinación de los componentes del hueso vertidos a la circulación durante la resorción ósea (calcio, hidroxiprolina, piridinolinas, telopéptidos).

MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

El osteoblasto realiza dos funciones fundamentales dentro del proceso de formación del hueso:

- Síntesis de proteínas de la matriz: Entre las proteínas sintetizadas por el osteoblasto están el colágeno y la osteocalcina. Por cada molécula de colágeno I que sintetiza el osteoblasto se produce una molécula de propéptido aminoterminal de procolágeno I (PINP) y otra de propéptido carboxiterminal procolágeno I (PICP).

Por tanto, los niveles de osteocalcina, PINP y PICP en suero nos servirán como índices cuantitativos de la actividad del osteoblasto.

- Mineralización de la matriz ósea: En el proceso de mineralización ósea está directamente implicada la fosfatasa alcalina liberada por los osteoblastos.

Por este motivo, los marcadores de formación ósea más utilizados en la actualidad, son:

- Fosfatasa alcalina total.
- Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina.
- Osteocalcina.
- Propéptido aminoterminal del procolágeno I.
- Propéptido carboxiterminal del procolágeno I.

A continuación vamos a centrarnos en el marcador de remodelado óseo que utilizaremos en la parte experimental de la presente tesis:

Fosfatasa alcalina (FAO)

La isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina es una enzima sintetizada por los osteoblastos durante el proceso de la mineralización.

La fosfatasa alcalina total (FAT) lleva utilizándose durante más de 50 años como índice de formación ósea. Es fácil y económica de analizar

y se encuentra incluida en el repertorio rutinario de los autoanalizadores de los laboratorios de bioquímica clínica. Sin embargo, la FAT es en realidad la mezcla de varias isoenzimas que circulan en el suero: ósea, hepática, renal, intestinal y placentaria (en caso de embarazo). De ellas, la ósea y la hepática constituyen las fracciones cuantitativamente más importantes y presentan la característica de ser proteínas procedentes de un mismo gen y que difieren únicamente en su grado de glicosilación. Por ello, ha sido muy difícil la cuantificación específica de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, aunque se ha intentado por electroforesis, inactivación diferencial, cromatografía líquida de alta presión...etc. Desde hace pocos años, sin embargo, se dispone de anticuerpos monoclonales específicos contra la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina.

Es importante destacar en este punto que incluso estos anticuerpos tienen una reactividad cruzada aproximadamente del 15% con la isoenzima procedente del hígado, por lo que la utilización de este marcador no es recomendable en presencia de una grave afectación hepática [54]. En ausencia de desórdenes hepáticos la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina es un marcador muy sensible y específico para detectar los cambios que tienen lugar en la tasa de formación ósea en la osteoporosis, tanto en condiciones basales como en respuesta al tratamiento [55, 56]. Su determinación puede hacerse en suero por ELISA.

MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

El osteoclasto realiza las funciones opuestas al osteoblasto.

A continuación se enumeran las principales funciones que realiza el osteoclasto y los marcadores de resorción empleados en la actualidad para medir cada uno de estos procesos:

- Degradación del mineral óseo.

- Calcio / Creatinina en orina: La anhidrasa carbónica, contribuye a la disolución del fosfato cálcico (hidroxiapatita), provocando una liberación de calcio y protones al medio. El calcio liberado pasa al líquido extracelular y es un índice indirecto de la tasa de destrucción del hueso.

- Liberación de enzimas.

- Fosfatasa ácida tartrato resistente: El osteoclasto libera una serie de enzimas como la catepsina K, metaloproteinasas y la fosfatasa ácida tartrato resistente. Esta última enzima sirve como marcador bioquímico de resorción ósea en suero.

- Degradación de la matriz del hueso.

- Durante la degradación del colágeno pasan a circular productos derivados de la rotura del mismo, como son:
 - Aminoácidos como la hidroxiprolina, que se medirá en orina.
 - Puentes de piridinolina y desoxipiridinolina.
 - Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I, unidos por puentes de piridinolina (ICTP).
 - Telopéptidos aminotermiales del colágeno I, unidos por puentes de piridinolina (NTX).
 - Telopéptido carboxiterminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (CTX).

A continuación vamos a centrarnos en los marcadores de resorción ósea que utilizaremos en la parte experimental de esta tesis:

Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX)

Este marcador de actividad osteoclástica es un fragmento de colágeno óseo que se produce durante el proceso de resorción. Se trata de una estructura molecular formada por tres fragmentos diferentes de distintas cadenas de colágeno (dos de la zona telopeptídica aminoterminal y una de la zona helicoidal), unidas entre sí por un puente de piridinolina.

Dado que el NTX se aclara por el riñón, los métodos para analizarlo se realizan en orina. El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra el NTX ha permitido realizar la cuantificación de este compuesto por ELISA. En los últimos años es posible realizar su determinación por electroquimioluminiscencia.

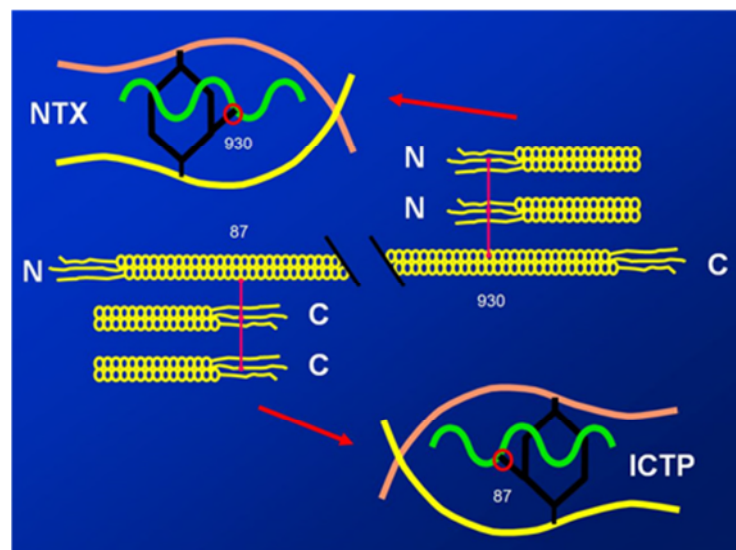


Figura 5. Telopéptidos amino (NTX) y carboxiterminales (ICTP) del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina. Ambas moléculas están formadas por 2 cadenas peptídicas correspondientes a la zona amino o carboxiterminal, respectivamente, del colágeno, un trozo de cadena de colágeno correspondiente a la zona helicoidal y un puente de piridinolina formado entre 3 aminoácidos de las tres cadenas colágenas (hidroxilisinas o lisinas).

1.10. PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA ERITROPOYESIS Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA CALIDAD ÓSEA

Los niveles de vitamina D están asociados con la anemia pero se desconoce el mecanismo exacto que conduce a este hecho. La mayoría de los estudios que relacionan la deficiencia de vitamina D y el grado de anemia renal apuntan al papel prevalente de la inflamación en este mecanismo [57]. La activación de los RVD inhibe la expresión de citocinas inflamatorias del estroma y eleva la liberación de interleuquina 10, ejerciendo actividad anti-inflamatoria y efectos proliferativos sobre los progenitores eritroides. En los pacientes con insuficiencia renal, la deficiencia de vitamina D puede estimular a las células inmunes en el micro ambiente de la médula ósea a producir citocinas, provocando un fallo en la eritropoyesis [58]. A este respecto, Kendrick y col. [59] estudiaron 16.301 pacientes en el “National Health and Nutrition Examination Survey: NHANES III”, observando que los niveles descendidos de 25(OH)D y elevados de proteína C reactiva estaban asociados independientemente con concentraciones menores de hemoglobina en sujetos con insuficiencia renal crónica que no requerían diálisis. En otra investigación, López-Mahillo et al [60], tampoco encontraron una correlación entre niveles de 25(OH)D y proteína C reactiva. Sin embargo, no objetivaron una correlación significativa entre los niveles de proteína C reactiva y hemoglobina, aunque sí fue próxima a la correlación ($p < 0,088$), lo que podría indicar que la inflamación afecta a la anemia, pero de manera independiente a la de la vitamina D.

En la última fase de la eritropoyesis, la eritropoyetina es el estímulo fundamental de la maduración eritroide y la falta de esta hormona es la mayor causa de la anemia en la insuficiencia renal [61]. Recientes

estudios sugieren que la vitamina D juega un papel fundamental en la síntesis de eritropoyetina [62].

Otro posible mecanismo sobre la anemia es que la vitamina D estimula directamente los precursores eritroides. Se han descubierto numerosos RVD en muchos tejidos no renales, incluida la médula ósea [63, 64]. La normalización de los niveles de 25(OH)D en este tejido puede provocar una cantidad suficiente de sustrato para la 1,25-hidroxilasa extrarrenal, y estas concentraciones elevadas de 1,25(OH)₂D en los tejidos hematopoyéticos pueden activar directamente las células precursoras eritroides [65]. De hecho, hay autores que postulan que la administración de 25(OH)D puede acarrear más beneficios para mejorar la anemia de los enfermos con insuficiencia renal que la administración de 1,25(OH)₂D, suministrando sustrato a la médula ósea para sintetizar 1,25(OH)₂D de modo autocrino o paracrino [66].

Con respecto al mecanismo de reducción de la actividad de la eritropoyetina en el caso de la deficiencia de vitamina D, está también relacionado con la producción de citocinas proinflamatorias, que estimulan la síntesis de hepcidina. La hepcidina, un pequeño polipéptido producido y segregado por el hígado, es un mediador de la absorción y la utilización del hierro. La excesiva producción de hepcidina contribuye a que no haya hierro disponible para los precursores eritroides y por lo tanto, a que se desarrolle la anemia aunque exista suficiente cantidad de eritropoyetina [67].

Centrándonos en el papel que la vitamina D ejerce en el mantenimiento de la calidad ósea, debemos recordar que es bien conocido que aumenta las concentraciones de calcio sérico y así favorece la mineralización ósea [41]. En niños, los niveles bajos de 25(OH)D se asocian a raquitismo y, en adultos, a osteomalacia y mayor riesgo de osteoporosis [47].

1.11. PAPEL DEL HIERRO EN LA PRODUCCIÓN DE VITAMINA D Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA CALIDAD ÓSEA

El hierro participa en el segundo paso de la activación de la vitamina D, necesario para convertirla en hormona funcional. Esta acción se realiza gracias a la 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa renal, que es una enzima compuesta por citocromo P450, ferredoxina y una ferredoxin reductasa [67]. Por lo tanto, niveles bajos de hierro pueden comprometer la producción de la forma activa de la vitamina D.

A su vez, se precisa hierro para la síntesis de colágeno, puesto que interviene como cofactor para las prolil y lisil hidroxilasas. Estas enzimas actúan sobre la principal cadena peptídica originando una triple hélice que sirve para estabilizar el colágeno en condiciones fisiológicas [69]. Estos datos nos hacen suponer que si los niveles de hierro disminuyen, también se reducirá la actividad de las prolil y lisil hidroxilasas y, por tanto, las fibras de colágeno serán más débiles. De hecho, existen estudios en ratas en los que se relaciona la presencia de anemia ferropénica con efectos deletéreos en sus huesos, como disminución de su contenido mineral óseo, de su densidad mineral ósea y de su fuerza muscular [70, 71, 72].

En humanos, los estudios disponibles revelan resultados menos concluyentes. Existe un estudio en mujeres jóvenes en el que se objetiva que la densidad mineral ósea del radio está relacionada con sus niveles séricos de ferritina [73]. En mujeres postmenopáusicas, se ha objetivado que las pacientes con fractura de cadera osteoporótica presentan deficiencia de hierro, en comparación con los controles [74]. Por lo tanto, podemos postular que las mujeres que padecen deficiencia de hierro durante décadas es posible que, más adelante, desarrollen osteoporosis. Sin embargo, no existen estudios sobre el metabolismo óseo de mujeres

menstruantes con deficiencia de hierro y los posibles efectos en el recambio óseo tras la recuperación de los niveles óptimos de hierro.

1.12. COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro y de vitamina D son desórdenes nutricionales tremendamente extendidos por el mundo. Parece que el déficit de hierro produce interacciones sobre el metabolismo de la vitamina D, y al parecer también el déficit de vitamina D ejerce una gran influencia sobre el déficit de hierro y la anemia.

Sin embargo, no es bien conocido el efecto que la presencia combinada de ambas deficiencias produce sobre el metabolismo óseo y especialmente en mujeres jóvenes entre las que existe una gran prevalencia de anemia ferropénica y de deficiencia de vitamina D.

Los hechos aquí descritos y a lo largo de la introducción de esta tesis nos han llevado a proponer los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Estudiar la prevalencia de anemia ferropénica en mujeres menstruantes entre 18 y 35 años en nuestro entorno (en la Dirección Asistencial Centro de Madrid) durante los años 2010 a 2015.
- Estudiar la variación del status de marcadores del metabolismo del hierro tras el consumo durante 4 meses de una bebida (zumo de frutas) fortificada en hierro en un grupo de mujeres jóvenes (18-35 años) con bajos niveles de hierro definidos como ferritina < 40 ng/ml y hemoglobina ≥ 11 g/dl.
- Estudiar simultáneamente la variación de los niveles de 25 hidroxivitamina D en dichas mujeres.
- Analizar los efectos producidos sobre el metabolismo óseo por dicho aporte de hierro, valorando las variaciones de los niveles de hormona paratiroidea (PTH) y los marcadores de remodelado óseo: fosfatasa alcalina ósea (FAO) y telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX).
- Valorar si la recuperación del status de hierro a través del consumo del zumo fortificado es dependiente de los valores basales de 25 hidroxivitamina D al comenzar el tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO DEL NÚMERO DE PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA EN LA DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Se acudió a la Dirección Asistencial Centro de Atención Primaria de la Comunidad de Madrid y se accedió a `consult@web`, que consiste en una herramienta del Servicio Madrileño de Salud que nos permite acceder a datos basados en las historias clínicas de los 49 centros de salud adscritos a dicha Dirección Asistencial. Se buscó el número de pacientes de sexo femenino, de 18 a 35 años que durante los años 2010 a 2015 estaban diagnosticadas de anemia ferropénica, codificada como B80 según la Clasificación Internacional de Atención Primaria CIAP-2. Posteriormente se combinaron estos datos con los códigos CIAP-2 de otros procesos que podrían relacionarse con el diagnóstico de anemia ferropénica con independencia de la menstruación de características normales de las mujeres en edad fértil. En la Tabla 1 se muestran estos códigos CIAP-2 utilizados en el estudio.

CIAP-2	DIAGNÓSTICO	CIAP-2	DIAGNÓSTICO
B78	Talasemia	T86	Hipotiroidismo
D85	Úlcera duodenal	T90	Diabetes mellitus
D86	Úlcera péptica	U06	Hematuria
D94	Crohn / Colitis ulcerosa	U99	Insuficiencia renal
D99	Enfermedad celiaca	W78	Embarazo confirmado deseado
P17	Fumadora	X05	Amenorrea
T85	Hipertiroidismo	X11	Menopausia

Tabla 1. Códigos CIAP-2 con sus correspondientes procesos asociados que pueden relacionarse con el diagnóstico de anemia ferropénica con independencia de la menstruación de características normales en las mujeres en edad fértil.

En la Tabla 2 se muestran los centros de salud adscritos a la Dirección Asistencial Centro del Servicio Madrileño de Salud.

CENTROS DE SALUD DE LA DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO DE MADRID	
Abrantes	Los Ángeles
Almendrales	Los Cármenes
Andrés Mellado	Los Rosales
Baviera	Los Yébenes
Campamento	Lucero
Carabanchel Alto	Maqueda
Caramuel	Montesa
Castelló	Nuestra Señora de Fátima
Cea Bermúdez	Orcasitas
Ciudad Jardín	Orcasur
Comillas	Perales del Río
Daroca	Potes
El Espinillo	Potosí
Eloy Gonzalo	Príncipe de Vergara
Espronceda	Prosperidad
General Fanjul	Puerta Bonita
General Ricardos	Puerta del Ángel
Goya	Quince de Mayo
Guayaba	San Andrés
Guzmán el Bueno	San Cristóbal
Joaquín Rodrigo	San Fermín
Lagasca	Santa Hortensia
Las Águilas	Segre
Las Calesas	Valle Inclán
Londres	

Tabla 2. Centros de salud adscritos a la Dirección Asistencial Centro del Servicio Madrileño de Salud.

Este estudio fue aprobado por la Comisión Local de Investigación de la Dirección Asistencial Centro del Servicio Madrileño de Salud.

3.2. ESTUDIO EN MUJERES JÓVENES CON FERROPENIA

A 124 mujeres jóvenes se les realizó una encuesta de salud y una primera analítica, que además de servir para decidir la inclusión o no en el estudio, se aprovechó de punto basal del mismo. En caso de inclusión se explicó a la paciente que durante cuatro meses debería tomar 500 ml diarios de un zumo fortificado en hierro o placebo. La bebida se suministró de manera gratuita y se realizaron determinaciones analíticas a las pacientes a los 2 y 4 meses de comenzado el estudio. Las muestras de suero y sangre total se extrajeron por la mañana, tras 12 horas de ayuno. El suero se separó tras centrifugación y se realizaron alícuotas que se conservaron a -80°C hasta el momento de la determinación correspondiente.

3.2.1. PACIENTES

Las voluntarias fueron reclutadas mediante carteles situados en la zona de la Ciudad Universitaria de Madrid.

Se reclutaron 124 mujeres jóvenes (18-35 años), en edad fértil, que presentaban niveles bajos de ferritina, pero sin anemia ferropénica.

Los criterios de inclusión fueron: mujer adulta, menstruante, edad 18-35 años, ferritina < 40 ng/ml y hemoglobina ≥ 11 g/dl.

Los criterios de exclusión fueron: enfermedades relacionadas con el metabolismo del hierro (anemia ferropénica, talasemia, etc), enfermedades digestivas (úlceras digestivas, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, malabsorción intestinal, etc); fumadora, enfermedades hormonales (hipotiroidismo, hipertiroidismo, diabetes, etc.); enfermedades renales, embarazo, lactancia, amenorrea, menopausia y alergia a los componentes de los alimentos objeto del estudio de intervención nutricional.

Se registró un cuestionario de salud general o historia clínica de las participantes. Se informó del estudio a las voluntarias, y se les hizo firmar un consentimiento informado.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda y por el Comité del Consejo Nacional Español de Investigación, Madrid, España.

Un subgrupo de las voluntarias anteriormente mencionadas fue seleccionado al azar (n=41) para participar en un estudio doble-ciego de 16 semanas de duración de Noviembre a Marzo. Se hicieron 2 subgrupos con las pacientes: Grupo P (placebo, n=18) y Grupo F (hierro, n=23), que consumirán 500 ml/día de zumo de frutas placebo o zumo fortificado en hierro, respectivamente.

INTERVENCIÓN NUTRICIONAL

Los zumos placebo y fortificados en hierro se suministraron en cajas de cartón de 500 ml en dos sabores diferentes (naranja y melocotón), para facilitar a las participantes su ingesta diaria. En cada 500 ml de zumo fortificado se añadieron 18 mg de hierro en forma de pirofosfato de hierro microencapsulado recubierto con lecitina, equivalente al 100% de la cantidad diaria recomendada [75, 76]. Todos los zumos

fueron fortificados con vitamina C. La composición nutricional de los zumos fue facilitada por el fabricante (Grupo Leche Pascual, Burgos). Los zumos de naranja proporcionaban (por cada 100 ml) 188 kJ, 0.6 g de proteínas, 10.5 g de carbohidratos y 19 mg de vitamina C; el zumo de naranja fortificado en hierro proporcionaba 3.6 mg de hierro, mientras que el placebo tenía 0.084 mg. Los zumos de melocotón proporcionaban (por cada 100 ml) 201 kJ, 0.6 g de proteínas, 11.3 g de carbohidratos y 19 mg de vitamina C; el zumo de melocotón fortificado en hierro proporcionaba 3.6 mg de hierro, mientras que el placebo tenía 0.136 mg [21]. Se les adiestró a las participantes para que alternaran los sabores de los zumos (naranja un día y melocotón al día siguiente). Los 500 ml del envase debían beberse en una sola toma, separados de las comidas (al menos 2 horas) y habiendo sido agitados previamente. Las voluntarias que no podían beberse un envase un día, debían beberse dos al día siguiente.

CONTROL DE LA DIETA Y CUMPLIMIENTO

La ingesta dietética de cada participante se evaluó al comienzo del estudio y cada 8 semanas para controlar posibles cambios en la ingesta de energía y nutrientes. Cada voluntaria recogía cada 72 h un informe previamente validado [77, 78] con el fin de evaluar los nutrientes que ingería: los tipos de comida y los pesos de las raciones. Los alimentos, la energía y los nutrientes de cada día fueron calculados con una aplicación informática utilizando la Base de Datos Española de Composición de Alimentos [79].

3.2.2. DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO

A todas las participantes en el estudio se les determinaron el hierro sérico, la hemoglobina, la ferritina, la transferrina y el % de saturación de

la transferrina. Se determinaron mediante técnicas automáticas estandarizadas.

Dichas determinaciones se realizaron en el laboratorio Fundación Jiménez Díaz-Unilabs, donde se realizó la extracción de la sangre de las 124 voluntarias. Por otra parte se separó y se alicuotó el suero de las voluntarias, que se congeló a -80°C para la realización de las diversas determinaciones. También se recogió la segunda orina de la mañana de las voluntarias y se alicuotó y congeló a -80°C para la realización de la determinación del NTX en orina. El alicuotado de las muestras fue realizado por los distintos miembros del equipo de investigación.

3.2.2.1. DETERMINACIÓN DEL HIERRO SÉRICO

La determinación de hierro sérico se realizó en un autoanalizador (Sistema integrado VITROS 5600). El sistema analítico de VITROS consiste en unas láminas superpuestas sobre un soporte de poliestileno. Una gota del suero de la paciente se deposita sobre la primera lámina y pasa hacia las láminas inferiores. El hierro (como ion férrico) es separado de la transferrina a pH ácido y pasa a la capa inferior reductora donde el ácido ascórbico reduce el hierro a ion ferroso. El ion ferroso se une a un colorante y forma un complejo coloreado en la lámina reactiva. El color se lee a 600nm. Y es proporcional a la concentración de hierro de la muestra.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son < 2 y $< 3.5\%$, respectivamente. La sensibilidad del método es de $10\text{ }\mu\text{g/dl}$. El rango aconsejado de medida del método es entre 10 y $600\text{ }\mu\text{g/dl}$.

3.2.2.2. HEMOGLOBINA SÉRICA

Este parámetro se midió en un autoanalizador automático LH780 (Beckman Gultex). La hemoglobina se mide directamente utilizando una

medición de tipo fotomático. En este proceso un haz de luz blanca procedente de un foco incandescente pasa a través de un filtro óptico y de la muestra y es leído por unas fotoceldas. Esto genera una corriente proporcional a la hemoglobina presente. La sensibilidad del método es de 2 g/dl, su coeficiente de variación intra-análisis es < 4% y su coeficiente inter-análisis es < 6%.

3.2.2.3. FERRITINA

Se utilizó un autoanalizador VITROS 5600, de Ortho Clinical Diagnostics (Johnson and Johnson), equipado con el sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ, y como reactivo fundamental el VITROS Ferritin Reagent Pack. La sensibilidad del método es de 0.29 ng/ml, su coeficiente de variación intra-análisis es < 4.5% y su coeficiente inter-análisis es < 6.5%.

3.2.2.4. TRANSFERRINA

Se utilizó un inmunoensayo turbidimétrico realizado en un equipo ADVIA 2400. Los coeficientes de variación intra e inter-análisis son < 1.1% y < 1.8% respectivamente. La sensibilidad del método es 0.01 mg/dl.

3.2.2.5. ÍNDICE DE SATURACIÓN

Se obtuvo mediante la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\text{Hierro} \times 100}{\text{Transferrina} \times 1.27}$$

3.2.3. ESTUDIO DE NIVELES DE HORMONAS IMPLICADOS EN METABOLISMO DEL CALCIO

3.2.3.1. 25 HIDROXIVITAMINA D

La 25(OH)D se determinó en el suero de las pacientes mediante una técnica de ELISA (25-hydroxy vitamin D EIA, IDS, UK). Los calibradores, controles y muestras se diluyeron con biotina marcada con 25 hidroxivitamina D. Las muestras diluidas se incubaron durante 2 h en los pocillos de la placa de ELISA que estaban recubiertos con un anticuerpo anti-25 hidroxivitamina D altamente específico. Tras la aspiración del sobrenadante y el lavado de la placa, se añadió la enzima (peroxidasa) unida a avidina, que se unió al complejo de biotina y, después de otra etapa de lavado, se desarrolló el color usando un sustrato cromogénico (TMB). La absorbancia se leyó en lector de placas ELISA a 450 nm. La absorbancia de la muestra es inversamente proporcional a la concentración de 25(OH)D en cada pocillo. Los coeficientes de variación intra e inter-análisis son < 5.6% y < 6.4%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 2 ng/ml.

3.2.3.2. DETERMINACIÓN DE PTH EN SUERO

La determinación de PTH se realizó en un autoanalizador Elecsys 2010 (Roche) por electroquimioluminiscencia.

1ª Incubación: La muestra de suero que contenía la PTH se incubó con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-PTH y con un segundo anticuerpo monoclonal anti-PTH marcado con un quelato de rutenio.

2ª Incubación: Se añadieron micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina de modo que el complejo formado se fijó a las micropartículas por la interacción entre la biotina y la estreptavidina.

3ª Incubación: La mezcla de reacción se trasladó a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Se lavó. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produjo una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se midió directamente con un fotomultiplicador, y era directamente proporcional a la cantidad de PTH que había.

La sensibilidad del método es de 1.20 pg/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo son < 2.5% y < 3%, respectivamente.

3.2.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

3.2.4.1. ISOENZIMA ÓSEA DE LA FOSFATASA ALCALINA (FAO)

La FAO se determinó en suero mediante una técnica de ELISA (Ostase® BAP, IDS, UK). Los pocillos de la placa de ELISA estaban recubiertos con estreptavidina. Se hicieron reaccionar las muestras con un anticuerpo monoclonal antifaz unido a biotina. Esta reacción tuvo lugar en los pocillos (encima de la placa). Se formó el complejo estreptavidina-biotina-anticuerpo antiFAO-FAO. Se lavó la placa para eliminar los excedentes que no habían reaccionado y, a continuación, se añadió un sustrato enzimático de la FAO (p-nitrofenilfosfato). Dicho sustrato, por acción de la FAO, se transformó en paranitrofenol, que es de color amarillo. La concentración de FAO fue directamente proporcional a la absorbancia resultante. La lectura se realizó a 450 nm. La sensibilidad del método es de 0.7 µg de BAP/l. Los coeficientes de variación intra e interensayo son < 4% y <4.5%.

3.2.5. TELOPÉPTIDO AMINOTERMINAL DEL COLÁGENO 1 (NTX)

El NTX se determinó en la orina de las pacientes mediante una técnica de ELISA (OSTEOMARK® NTx Urine, Wampole laboratorios, NJ,

USA). Los pocillos de la placa de ELISA estaban recubiertos de NTX. Entonces, se añadió a los pocillos la muestra (que contenía NTX) y un anticuerpo monoclonal unido a peroxidasa. El NTX de la muestra competía con el NTX unido a las placas para unirse al anticuerpo. Tras la etapa de lavado, se quedó unido a la placa el complejo NTX-anticuerpo-peroxidasa, cuya cantidad será inversamente proporcional al NTX de la muestra. Se añadió entonces reactivo cromogénico tetrametilbencidina, que produjo color por acción de la peroxidasa. El color era inversamente proporcional a la cantidad de NTX de la muestra. La lectura se realizó a 450 nm. El resultado se expresó como equivalentes de colágeno óseo/l (ECO/l). Fue necesario realizar también la determinación de la concentración de creatinina de las muestras de orina, ya que el resultado final del ensayo se expresa como ECO/mMolar creatinina.

La creatinina se determinó en un autoanalizador VITROS 5.1, dentro del sistema integrado VITROS 5600 (Ortho Clinical Diagnostics). Este autoanalizador utiliza la denominada “química seca”, en la que los reactivos para cada técnica se encuentran incluidos dentro de un cartucho de plástico que contiene a su vez varias láminas o capas superpuestas (sistema de “microslides”).

La sensibilidad del método y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 0.05 mg/dl, < 1% y < 2.5%, respectivamente.

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como medias con sus desviaciones estándar (DS). Se ha obtenido una distribución normal de variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Los valores de ferritina fueron transformados logarítmicamente para su análisis estadístico. Se utilizó el test de correlación lineal de Pearson entre los niveles de 25(OH)D y los biomarcadores del hierro a nivel basal.

En los datos de intervención nutricional, se utilizaron los tests de ANOVA con medidas repetidas y, posteriormente, el de Bonferroni para estudiar a lo largo del tiempo los distintos grupos. Además, se realizaron comparaciones entre el grupo F (grupo que ingirió la bebida enriquecida en hierro) y el grupo P (grupo que ingirió la bebida placebo) mediante el test de ANOVA. Para conocer si la recuperación del status de hierro después de consumir la bebida enriquecida varía dependiendo de los niveles basales de vitamina D, se aplicó, para cada parámetro evaluado en los grupos F y P, un ANOVA de dos factores con medidas repetidas utilizando como factor diferenciador los niveles de 25(OH)D (< 50 nmol/l y ≥ 50 nmol/l). Al comienzo del estudio y en las semanas 8 y 16, se realizaron comparaciones entre los niveles de 25(OH)D que presentaban las voluntarias (< 50 nmol/l o ≥ 50 nmol/l) y se utilizó para ello el test de ANOVA. Se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$. Los datos fueron analizados con el software estadístico SPSS para Windows (versión 19.0).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. NÚMERO DE MUJERES CON ANEMIA FERROPÉNICA ATENDIDAS EN LA DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO DE LA COMUNIDAD DE MADRID

La Tabla 3 muestra el número de pacientes mujeres de 18 a 35 años adscrito a la Dirección Asistencial Centro durante los años 2010 a 2015, el número de ellas que fueron atendidas en sus respectivos Centros de Salud (CS) y el número de dichas pacientes y su proporción respecto a la población diana atendida que presentaban algún episodio de anemia ferropénica o anemia ferropénica en combinación con otros procesos relacionados con dicha anemia (talasemia, úlcera duodenal, úlcera péptica, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, fumadora, hipertiroidismo, hipotiroidismo, diabetes mellitus, hematuria, insuficiencia renal, embarazo confirmado deseado, amenorrea y menopausia). También se muestra el número de mujeres de 18 a 35 años que fueron atendidas en los CS de la Dirección Asistencial Centro durante 2010 a 2015 que fueron diagnosticadas de anemia ferropénica pero que no presentaron de manera concomitante ningún proceso que se relacione con el mencionado diagnóstico.

DIRECCIÓN ASISTENCIAL CENTRO: 2010-2015		
Número de pacientes mujeres entre 18-35 años	189495	
Número de pacientes mujeres entre 18-35 años atendidas	161315	
	Número de pacientes mujeres entre 18-35 años	% de mujeres de 18-35 años atendidas en los CS
Anemia ferropénica	6321	3.92
Anemia ferropénica + Talasemia	20	0.01
Anemia ferropénica + Úlcera duodenal	9	0.01
Anemia ferropénica + Úlcera péptica	5	0.00
Anemia ferropénica + Crohn / Colitis ulcerosa	16	0.01
Anemia ferropénica + Enfermedad celiaca	64	0.04
Anemia ferropénica + Fumadora	103	0.06
Anemia ferropénica + Hipertiroidismo	58	0.04
Anemia ferropénica + Hipotiroidismo	425	0.26
Anemia ferropénica + Diabetes mellitus	77	0.05
Anemia ferropénica + Hematuria	30	0.02
Anemia ferropénica + Insuficiencia Renal	8	0.00
Anemia ferropénica + Embarazo deseado confirmado	837	0.52
Anemia ferropénica + Amenorrea	754	0.47
Anemia ferropénica + Menopausia	5	0.00
Anemia ferropénica sin otras causas	3910	2.42

Tabla 3. Número de pacientes mujeres de 18 a 35 años adscrito a la Dirección Asistencial Centro durante los años 2010 a 2015, el número de ellas que fueron atendidas en sus respectivos Centros de Salud (CS) y el número de dichas pacientes y su proporción respecto a la población diana atendida que presentaban algún episodio de anemia ferropénica, anemia ferropénica en combinación con otros procesos relacionados con dicha anemia (talasemia, úlcera duodenal, úlcera péptica, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, fumadora, hipertiroidismo, hipotiroidismo, diabetes

mellitus, hematuria, insuficiencia renal, embarazo confirmado deseado, amenorrea y menopausia) o anemia ferropénica sin presentar de forma concomitante ninguno de los procesos anteriormente mencionados.

Como podemos observar, de las 161315 pacientes mujeres entre 18 y 35 años atendidas en los CS de la Dirección Asistencial Centro durante 2010 a 2015, 6321 fueron diagnosticadas de anemia ferropénica. La mayoría de ellas, 3910 (un 61.8% de todos los diagnósticos de anemia ferropénica), no presentaban otros procesos concomitantes a la anemia que estuvieran relacionados con dicho diagnóstico.

4.2. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL HIERRO Y NIVELES DE 25 HIDROXIVITAMINA D DEL GRUPO TOTAL (n=124) Y DEL SUBGRUPO DE VOLUNTARIAS (n=41)

La Tabla 4 muestra los parámetros relacionados con el hierro y niveles de 25(OH)D del grupo total (n=124) y del subgrupo de voluntarias (n=41).

Dado que el subgrupo de intervención se había elegido al azar, no se observan diferencias significativas entre los grupos.

	Grupo total (n=124)	Subgrupo (n=41)
Edad (años)	24.3 ± 4.8	25.5 ± 5.9
Índice de masa corporal (kg/m ²)	21.7 ± 2.2	21.8 ± 2.3
Hemoglobina (g/dl)	13.2 ± 0.9	13.2 ± 0.8
Ferritina (ng/ml)	26.4 ± 17.5	22.6 ± 12.2
Transferrina (mg/dl)	314.5 ± 60.5	318.6 ± 53.8
Saturación de transferrina (%)	19.3 ± 9.2	17.1 ± 7.7
25 hidroxivitamina D (nmol/l)	54.2 ± 18.0	50.2 ± 14.0

Las diferencias entre grupos no fueron significativas. Los datos son media ± DS.

Tabla 4. Parámetros relacionados con el hierro y niveles de 25(OH)D del grupo total (n=124) y del subgrupo de voluntarias (n=41).

Determinamos los niveles basales de 25(OH)D de las 124 participantes y observamos que un 6% (7 participantes) presentaban valores inferiores a 10 ng/ml (< 25 nmol/l), valores muy deficientes; el 36% (45 participantes) entre 10 - 20 ng/ml (25 nmol/l - 50 nmol/l), valores deficientes; el 49% (61 participantes) entre 20 - 30 ng/ml (50 nmol/l - 75 nmol/l), valores insuficientes; el 7% (9 participantes) entre 30 - 40 ng/ml (75 nmol/l - 100 nmol/l), valores adecuados; sólo 2 de ellas (2%) superaban los 40 ng/ml (100 nmol/l). Esto pone de manifiesto un profundo déficit de vitamina D.

Se observó una correlación positiva entre los niveles de 25(OH)D y la saturación de transferrina (p=0.007), pero no se obtuvo ninguna correlación entre 25(OH)D y hemoglobina, ferritina sérica o transferrina.

4.3. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA CONSUMIDA POR EL GRUPO TOTAL DE MUJERES

La Tabla 5 muestra la energía y cantidad de nutrientes consumidos por el grupo total de mujeres deficientes en hierro. No encontramos correlaciones significativas entre el aporte de nutrientes y los niveles de 25(OH)D, ni entre el aporte de nutrientes y los parámetros relacionados con el hierro.

Energía (kJ/día)	9091 ± 2512
Proteínas (%energía/día)	14.6 ± 4.2
Carbohidratos (%energía/día)	41.8 ± 13.0
Lípidos (%energía/día)	40.2 ± 13.4
Hierro (mg/día)	14.1 ± 4.7
Calcio (mg/día)	977.5 ± 355.8
Magnesio (mg/día)	283.8 ± 87.9
Fósforo (mg/día)	1423 ± 363
Vitamina D (µg/día)	3.0 ± 2.4
Vitamina C (mg/día)	131.2 ± 60.8
Vitamina K (µg/día)	134.0 ± 89.6

Los datos son media ± DS.

Tabla 5. Energía y macronutrientes de un grupo de 124 mujeres deficientes en hierro.

4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA CONSUMIDA POR EL SUBGRUPO DE MUJERES QUE VAN A INGERIR EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO O EL ZUMO PLACEBO

La Tabla 6 muestra la energía y la ingesta de nutrientes en las 41 mujeres que van a consumir durante 16 semanas zumo fortificado en hierro o zumo placebo, tanto en condiciones basales como en la semana 16, al final del tratamiento.

	Grupo	Basal	16 semanas	p
Energía (kJ/día)	Placebo	9087 ± 2282	10420 ± 2846	NS
	Fortificado	8477 ± 1816	9571 ± 2489	NS
Proteína (%energía/día)	Placebo	14.9 ± 2.6	13.3 ± 1.8	0.02
	Fortificado	14.1 ± 2.4	13.5 ± 2.3	NS
Carbohidratos (%energía/día)	Placebo	38.7 ± 7.7	42.7 ± 8.3	NS
	Fortificado	42.5 ± 5.8	43.9 ± 6.6	NS
Lípidos (& energía/día)	Placebo	42.5 ± 7.7	39.3 ± 7.0	NS
	Fortificado	39.9 ± 6.5	39.0 ± 6.2	NS
Hierro (mg/día)	Placebo	15.6 ± 5.5	14.0 ± 5.5	NS
	Fortificado	13.1 ± 3.5	32.1 ± 9.1 ^a	<0.001
Calcio (mg/día)	Placebo	1044 ± 380	1003 ± 412	NS
	Fortificado	905 ± 262	834 ± 310	NS
Magnesio (mg/día)	Placebo	266.8 ± 109.6	275.1 ± 92.1	NS
	Fortificado	267.2 ± 49.4	262.2 ± 95.3	NS
Fósforo (mg/día)	Placebo	1361.6 ± 348.9	1472.0 ± 509.6	NS
	Fortificado	1271.2 ± 273.9	1321.6 ± 470.2	NS
Vitamina D (µg/día)	Placebo	2.7 ± 2.2	3.7 ± 2.7	NS
	Fortificado	3.1 ± 2.5	3.9 ± 3.3	NS
Vitamina C (mg/día)	Placebo	136.3 ± 62.0	200.6 ± 60.4	<0.001
	Fortificado	122.5 ± 49.1	206.2 ± 81.7	<0.001
Vitamina K (µg/día)	Placebo	159.6 ± 148.4	151.0 ± 84.0	NS
	Fortificado	117.8 ± 63.9	147.1 ± 149.3	NS

NS= No significativo, a = significativo (<0.001) frente a los niveles de hierro del grupo placebo en la semana 16.

Tabla 6. Energía e ingesta de nutrientes de las 41 mujeres que han ingerido el zumo fortificado con hierro o el zumo placebo durante 16 semanas, en condiciones basales y al final del tratamiento.

Aunque el aporte de energía no muestra diferencias significativas entre las condiciones basales y a las 16 semanas en ninguno de los dos grupos, se obtiene un descenso de la energía debida a proteínas a las 16 semanas en el grupo placebo con respecto a las condiciones basales. Por otra parte, y como era de esperar, la ingesta de hierro en el grupo que había tomado el zumo fortificado aumentó significativamente a las 16 semanas. También se observa un aumento significativo de los niveles de vitamina C en ambos grupos de pacientes a las 16 semanas, ya que tanto el zumo fortificado como el placebo estaban enriquecidos en vitamina C.

4.5. HIERRO Y PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL HIERRO EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO

La Tabla 7 muestra los valores de hierro, hemoglobina, ferritina sérica, transferrina sérica y porcentaje de saturación de transferrina en las 23 mujeres que ingirieron durante 16 semanas el zumo enriquecido con hierro y en las 18 mujeres que ingirieron el zumo placebo.

	Grupo	Basal	Semana 8	Semana 16	p
Hierro ($\mu\text{g/dl}$)	Placebo	68.5 \pm 25	64.1 \pm 29	48.8 \pm 14	NS
	Fortificado	64.2 \pm 23	107.5 \pm 42	105.3 \pm 39	0.01
Hemoglobina (g/dl)	Placebo	13.0 \pm 0.8	13.4 \pm 0.8	13.1 \pm 0.7	NS
	Fortificado	13.3 \pm 0.9	13.7 \pm 0.9	13.7 \pm 0.7**	0.03
Ferritina sérica (ng/ml)	Placebo	22.5 \pm 13.7	26.4 \pm 18.8	20.2 \pm 14.6	NS
	Fortificado	22.4 \pm 11.6	34.1 \pm 15.9	33.5 \pm 16.9*	<0.001
Transferrina sérica (mg/dl)	Placebo	315.7 \pm 54.8	335.5 \pm 59.5	307.8 \pm 53.1	NS
	Fortificado	318.7 \pm 55.8	301.9 \pm 57.0	282.3 \pm 45.1	<0.001
Saturación transferrina (%)	Placebo	16.1 \pm 7.5	20.3 \pm 13.3	18.6 \pm 15.8	NS
	Fortificado	16.2 \pm 7.1	21.1 \pm 9.5	21.7 \pm 7.8	0.008

Tabla 7. Hierro y parámetros relacionados con el hierro en mujeres consumiendo zumo fortificado con hierro y placebo durante 16 semanas. p: significación estadística de la semana 16 respecto a la basal (t-Student); * y ** significaciones estadísticas entre P y F en la semana 16: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Como puede observarse en la Tabla 7, en el grupo F se producen aumentos significativos en el hierro, hemoglobina, ferritina sérica y niveles de saturación de transferrina y un descenso en los niveles de transferrina ($p=0.01$, $p=0.03$, $p<0.001$, $p=0.008$, $p<0.001$, respectivamente). Comparados con el grupo placebo, los niveles de hierro, hemoglobina y ferritina del grupo F son significativamente superiores en la semana 16 ($p=0.01$, $p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente).

La saturación de transferrina no varió durante el periodo experimental en el grupo placebo. Sin embargo, aumentó significativamente desde las 8 semanas en el grupo que tomaba zumo fortificado con hierro. La Figura 6 muestra el incremento en la saturación

de transferrina de este grupo de voluntarias dependiendo de los niveles basales de 25(OH)D. El aumento en la saturación de transferrina fue significativamente mayor a lo largo del tiempo en aquellas voluntarias cuyos niveles basales de 25(OH)D eran superiores a 50 nmol/l (20 ng/ml).

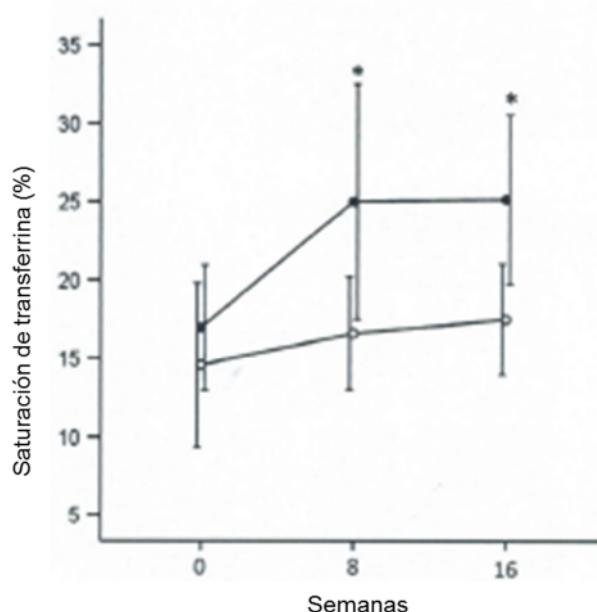


Figura 6. Saturación de transferrina en condiciones basales, a las 8 y 16 semanas en aquellas voluntarias que consumieron zumo fortificado con hierro dependiendo de sus niveles basales de 25(OH)D: < 50 nmol/l (círculos abiertos), ≥ 50 nmol/l (círculos cerrados). Los valores representan la media ± DS. Significación estadística: t de Student * p<0.05.

4.6. NIVELES DE 25(OH)D EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO

La Figura 7 y la Figura 8 muestran los niveles de 25(OH)D en las mujeres que ingieren el zumo placebo y fortificado con hierro. Como

puede observarse, los niveles de 25(OH)D no aumentan con el aporte de hierro, sino que incluso disminuyen significativamente con el tiempo en ambos grupos, sin diferencia significativa entre ellos.

25 (OH) vit D grupo P (nmol/l)		
	Media	DS
Basal	53.3	14.6
Semana 8	42.1	11
Semana 16	38.6	10.4

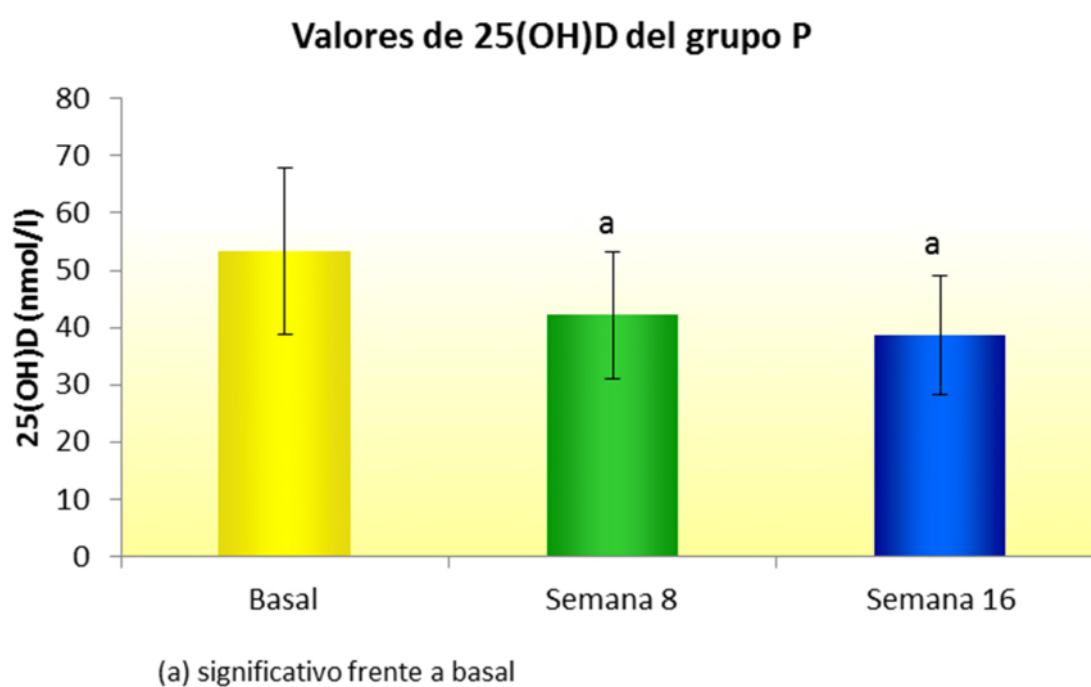


Figura 7. Niveles de 25(OH)D en voluntarias que han ingerido el zumo placebo durante 16 semanas.

25 (OH) vit D grupo F (nmol/l)		
	Media	DS
Basal	48.2	13.4
Semana 8	39.2	11.5
Semana 16	36.5	13.1

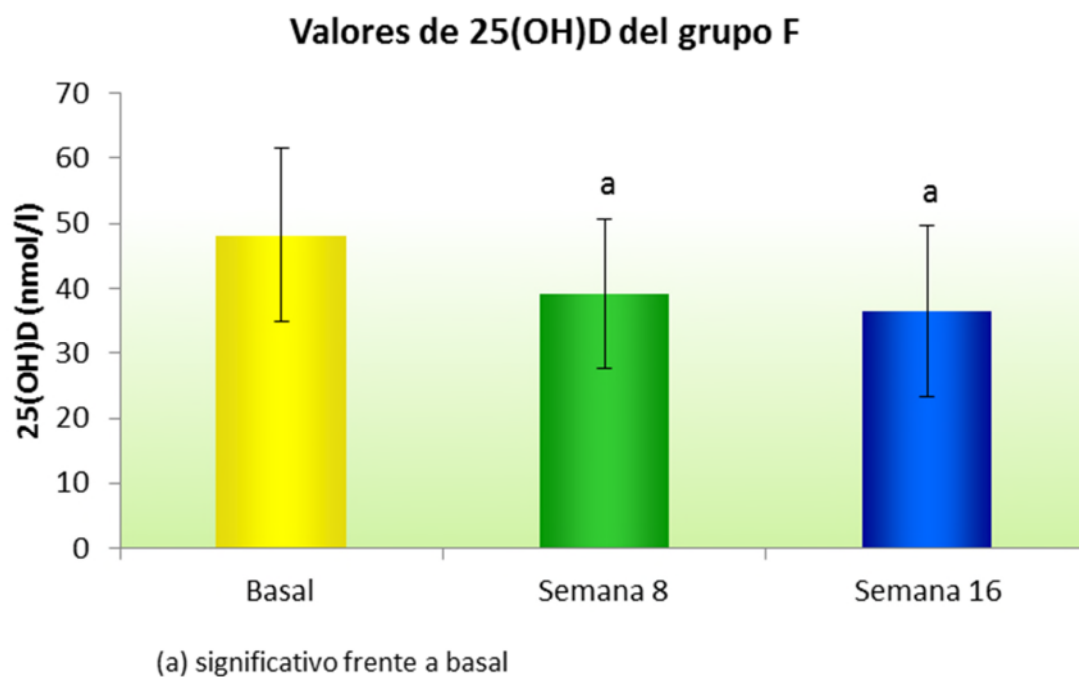


Figura 8. Niveles de 25(OH)D en voluntarias que han ingerido el zumo fortificado con hierro durante 16 semanas.

Nos centramos entonces en las 41 voluntarias que habían participado en el ensayo, con zumo placebo o enriquecido y calculamos la distribución de los niveles de 25(OH)D en los distintos momentos de la prueba (Tabla 8)

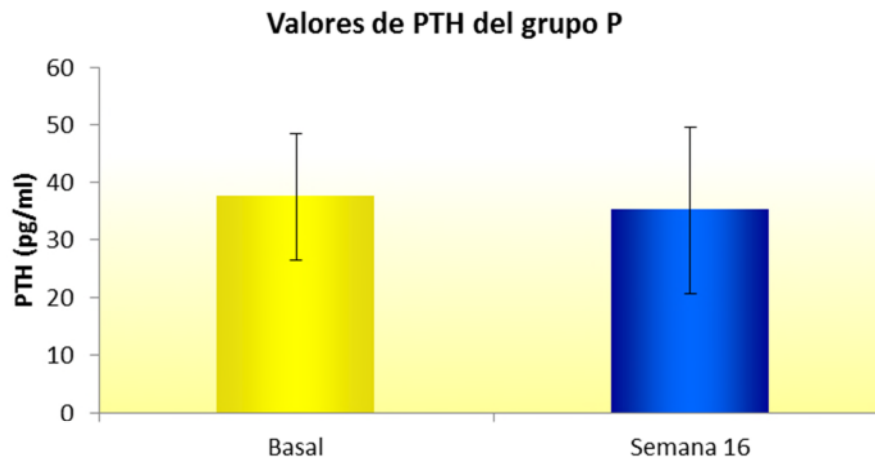
Valores de 25 (OH) D				
	< 25 nmol/l	25 - 49 nmol/l	50 - 74 nmol/l	≥ 75 nmol/l
Basal Nº mujeres (%)	2 (5%)	20 (49%)	17 (41%)	2 (5%)
Semana 8 Nº mujeres (%)	2 (5%)	30 (73%)	9 (22%)	-
Semana 16 Nº mujeres (%)	5 (13%)	29 (73%)	6 (15%)	-

Tabla 8. Distribución de los niveles de 25(OH)D en las mujeres que tomaron zumo fortificado con hierro o placebo a lo largo de la prueba.

4.7. NIVELES DE PTH EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO

La Figura 9 muestra los niveles de PTH en mujeres que ingieren el zumo placebo y el zumo fortificado con hierro. No se observan diferencias significativas entre los valores basales de PTH y los detectados a las 16 semanas de tratamiento. Tampoco hay diferencias significativas entre los dos grupos.

PTH grupo P (pg/ml)		
	Media	DS
Basal	37.6	11
Semana 16	35.2	14.5



PTH grupo F (pg/ml)		
	Media	DS
Basal	38.5	18.6
Semana 16	33.3	5.7

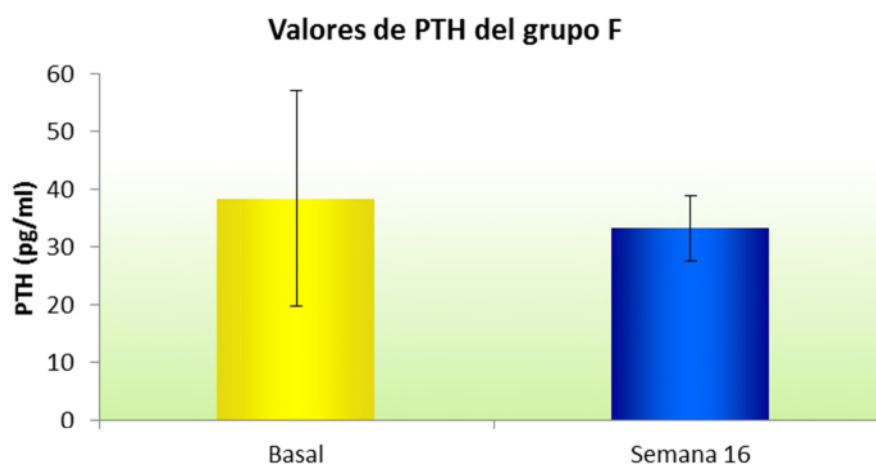


Figura 9. Niveles de PTH en las voluntarias que han ingerido el zumo placebo y el fortificado durante 16 semanas

4.8. NIVELES DE FOSFATASA ALCALINA ÓSEA EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO

Las siguientes figuras muestran los niveles de fosfatasa alcalina ósea en mujeres que ingieren el zumo placebo (Figura 10) y en mujeres que ingieren el zumo fortificado con hierro (Figura 11). No se observan diferencias significativas entre los valores basales de fosfatasa alcalina ósea y los detectados a las 8 y a las 16 semanas de tratamiento. Tampoco hay diferencias significativas entre los dos grupos.

Fosfatasa alcalina grupo P (µg/l)		
	Media	DS
Basal	10.3	3.1
Semana 8	10.6	2.2
Semana 16	10.7	2.8

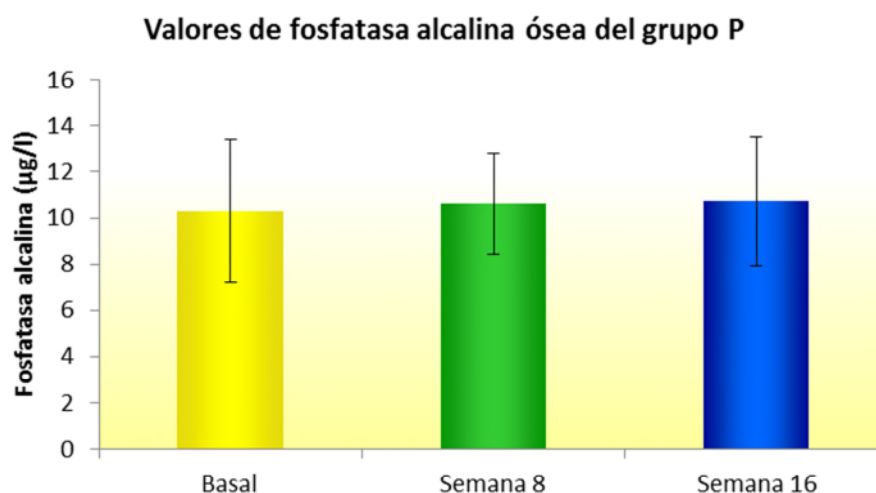


Figura 10. Niveles de fosfatasa alcalina ósea en voluntarias que han ingerido el zumo placebo durante 16 semanas.

Fosfatasa alcalina grupo F ($\mu\text{g/l}$)		
	Media	DS
Basal	12	3.6
Semana 8	12	2.9
Semana 16	12.5	3.5

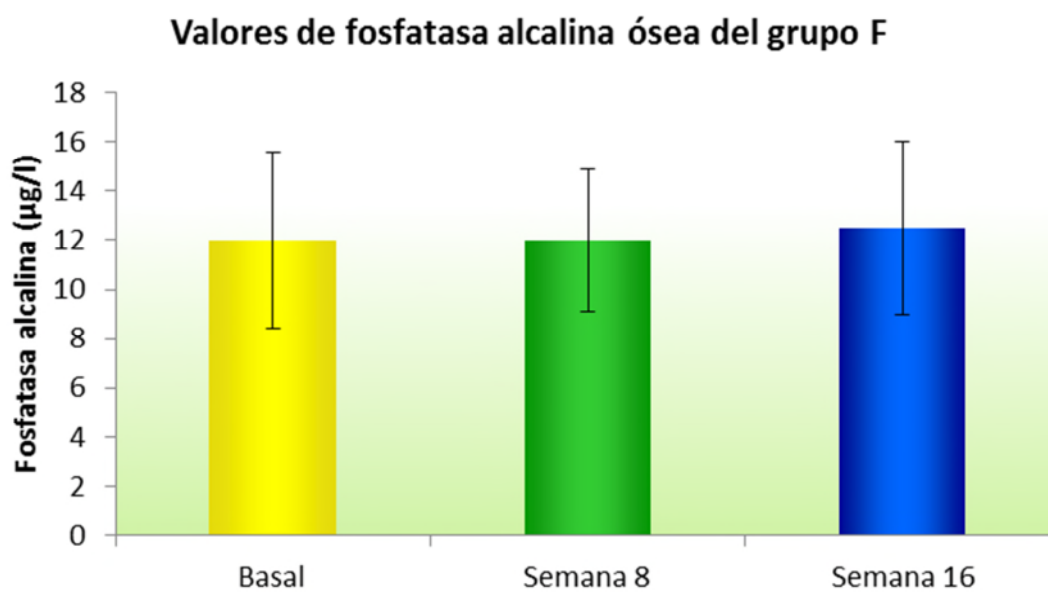


Figura 11. Niveles de fosfatasa alcalina ósea en voluntarias que han ingerido el zumo fortificado con hierro durante 16 semanas.

4.9. NIVELES DE NTX EN MUJERES QUE INGIEREN EL ZUMO FORTIFICADO CON HIERRO Y EL ZUMO PLACEBO

Las siguientes figuras muestran los niveles de NTX en mujeres que ingieren el zumo placebo (Figura 12) y el zumo fortificado con hierro (Figura 13). No se observan diferencias significativas entre los valores basales de NTX y los detectados a las 8 y a las 16 semanas de tratamiento. Tampoco hay diferencias significativas entre los dos grupos.

NTX grupo P (nmol BCE/mmol creatinina)		
	Media	DS
Basal	82.5	33.4
Semana 8	86.7	29.4
Semana 16	79.9	23.9

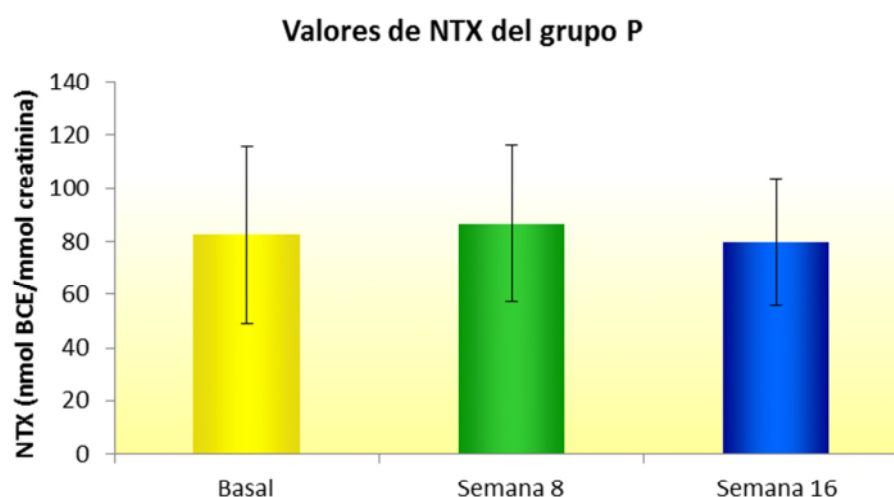


Figura 12. Niveles de NTX en voluntarias que han ingerido el zumo placebo durante 16 semanas.

NTX grupo F (nmol BCE/mmol creatinina)		
	Media	DS
Basal	72.8	31.3
Semana 8	82.5	29.6
Semana 16	78.7	30.1

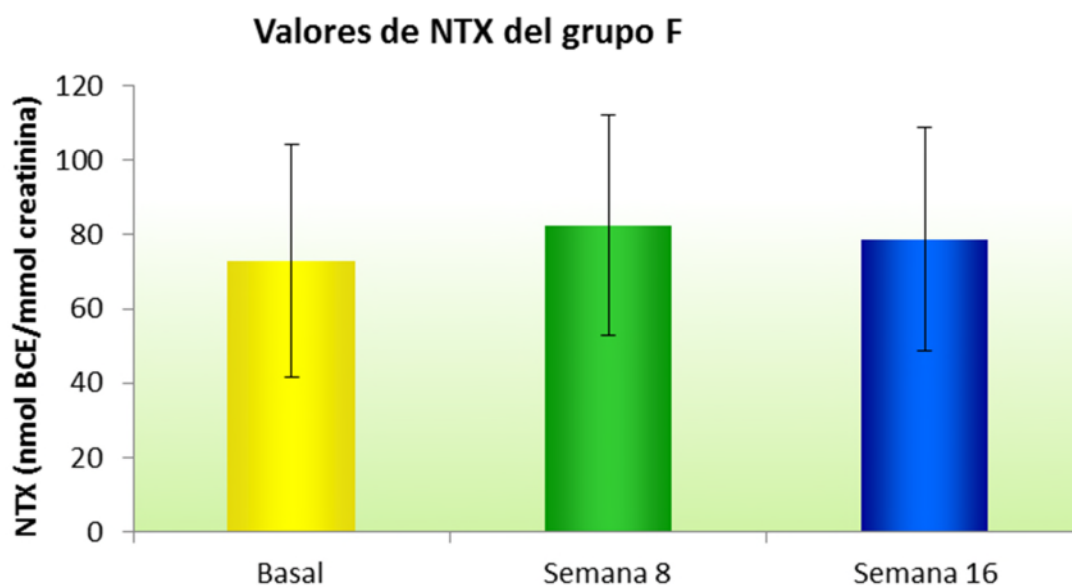


Figura 13. Niveles de NTX en voluntarias que han ingerido el zumo fortificado con hierro durante 16 semanas.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las deficiencias de vitamina D y de hierro se reconocen actualmente como los dos mayores problemas de salud pública en el mundo. Cerca del 30-50% de la población de todas las edades es deficiente en vitamina D [80]. Por otra parte, la OMS estima que casi 2 billones de personas sufren anemia en el mundo [3]. La anemia por deficiencia de hierro es el tipo más prevalente de anemia.

En España, la prevalencia de anemia ferropénica en adolescentes y varones adultos es inferior al 1%, mientras que en mujeres en edad fértil es del 4-5%. Un médico de Atención Primaria diagnostica aproximadamente entre 25-40 casos nuevos de anemia cada año, de los que el 75% serán debidos a déficit de hierro [81]. Datos parecidos obtuvimos en nuestro trabajo. Durante los años 2010 a 2015, presentaron anemia ferropénica el 3.9% de las pacientes mujeres de 18 a 35 años atendidas en los centros de salud de la Dirección Asistencial Centro de Madrid. La mayoría de ellas, un 61.8%, no presentaban otras patologías que estuvieran relacionadas con la anemia, lo que revela la radical importancia del suceso fisiológico de la menstruación en la etiología de la anemia de nuestras pacientes.

A su vez, la anemia y la deficiencia de vitamina D se han observado simultáneamente [82]. Algunos estudios asocian la anemia por deficiencia de hierro a la insuficiencia de vitamina D a causa de sus metabolismos relacionados [83, 84, 85]. Sin embargo, los resultados de estos estudios son inconsistentes debido a la heterogeneidad de los objetivos en estudio y a que no se determina la etiología de la anemia [86]. También hay trabajos evaluando el efecto de la toma de hierro sobre

la concentración de vitamina D [50, 87, 88, 89, 90, 91, 92], pero no llegan a resultados definitivos.

En el presente trabajo hemos tratado de determinar si existe una relación entre los niveles de 25(OH)D y los biomarcadores que establecen el estado del hierro en el organismo. También si el consumo de un zumo de frutas fortificado en hierro que mejoraría el estado de este mineral en el organismo tiene consecuencias sobre la salud del consumidor a nivel de marcadores de remodelado óseo, y por último si la recuperación de los niveles de hierro a través del consumo del zumo enriquecido depende del estado basal de niveles de vitamina D.

Aunque el metabolito activo de la vitamina D es la 1,25(OH)₂D, en este trabajo se utiliza como marcador del status de vitamina D del organismo la concentración de 25(OH)D, lo cual está aceptado universalmente como el mejor marcador para determinar el estado corporal de vitamina D [93]. El organismo corrige el descenso de vitamina D mediante la aparición de un hiperparatiroidismo secundario, aumentando los niveles de PTH y haciendo que se mantengan los niveles de 1,25(OH)₂D a pesar del déficit en vitamina D. En un interesante estudio, Need y cols [35], llegan a la conclusión de que la deficiencia de la vitamina D no reduce los niveles de 1,25(OH)₂D hasta que los niveles de 25(OH)D séricos no caen por debajo de 10 nmol/ml (4 ng/ml). A este nivel la cantidad de sustrato de la 1 α -hidroxilasa ya no es suficiente para mantener los niveles de 1,25(OH)₂D a pesar de la presencia del hiperparatiroidismo secundario.

Por otra parte, nuestro criterio para seleccionar la deficiencia de hierro ha sido niveles de ferritina < 40 ng/ml. Es importante también destacar en este punto que nuestra población en estudio (ferritina < 40 ng/ml y Hb \geq 11g/l) tiene deficiencia de hierro, pero no anemia ferropénica.

Lo primero que llama la atención al analizar los parámetros bioquímicos del grupo de voluntarias deficientes en hierro es que la mayoría

de las mujeres que participan en el estudio son deficientes o insuficientes en vitamina D en un porcentaje superior a los datos de hipovitaminosis D descritos para las adolescentes españolas (63%) [49] y para los adultos jóvenes españoles (61%) [94]. Si observamos la ingesta diaria de hierro y vitamina D en nuestra población en estudio en condiciones basales (Tabla 5), tanto la ingesta de vitamina D como la de hierro están por debajo de las “Recommended Dietary Allowance” (RDA) para este grupo de población (18 mg/día y 5 µg/día respectivamente) [75, 95]. Sin embargo, la mayor parte de la vitamina D del organismo proviene de la exposición al sol. En nuestro estudio, es posible que esta sea la causa de ese déficit por tratarse de un grupo de estudiantes en temporada de invierno.

Con respecto a otros nutrientes relacionados con la salud del hueso observamos ingestas adecuadas de calcio, magnesio, fósforo, vitamina C y vitamina K en nuestro grupo de voluntarias, nutrientes que maximizan la formación ósea y minimizan la resorción [96].

El hecho de encontrar tan alta deficiencia de vitamina D en las jóvenes ferropénicas de nuestro grupo de voluntarias nos podría hacer pensar en una asociación entre deficiencia de vitamina D y anemia. A este respecto, hemos encontrado en la literatura dos estudios observacionales en niños y adolescentes inmigrantes de África y Asia a regiones del Norte de Europa que detectaban una alta prevalencia de ambas deficiencias asociadas a diversos factores como malnutrición, pigmentación de la piel o que algunas mujeres llevaban cubierto todo el cuerpo [97, 98]. En este mismo sentido, Sharma y cols [99] realizaron un estudio en 263 niños en la India. Los dividieron en deficientes en vitamina D, insuficientes y suficientes según sus niveles de 25(OH)D. La anemia estaba presente en el 66% de los niños deficientes en vitamina D frente a un 35% en los individuos suficientes ($p < 0.001$). Más interesante, por el alto número de sujetos incluidos en el estudio, es el trabajo de Monlezun y cols [100]. Estos autores demostraron una asociación inversa entre los niveles de 25(OH)D y el riesgo de anemia

en una población de 5456 individuos (≥ 17 años) en el “National Health and Nutrition Examination Survey” desde 2001 a 2006. Hasta niveles de 25(OH)D de 20 ng/ml se observaba una relación prácticamente lineal entre el status de vitamina D y la frecuencia acumulativa de anemia. Cuando aumentaban los niveles de 25(OH)D la relación iba desapareciendo. Comparados con los individuos con 25(OH)D ≥ 20 ng/ml, los que tenían niveles < 20 ng/ml tenían mayor probabilidad de tener anemia. Los autores concluyen que serían necesarios ensayos clínicos aleatorios para estudiar si la optimización de los niveles de vitamina D podría reducir la frecuencia de anemia en la población general.

Nuestras voluntarias, con deficiencia de hierro, exhibían unos niveles muy bajos de vitamina D. Pero después de tomar el zumo fortificado y mejorar significativamente sus reservas de hierro, sus niveles de 25(OH)D no varían y continúan siendo tan bajos como al principio del estudio, incluso menores, posiblemente porque el estudio fue realizado a lo largo del invierno, de Noviembre a Marzo en Madrid, con la consiguiente reducción de la luz ultravioleta. Este hecho nos puede llevar a pensar que no hay relación entre niveles de hierro y niveles de 25(OH)D. Pero, sin embargo, en contra de esta hipótesis, observamos que las voluntarias que recuperan mejor sus niveles de transferrina tras la ingesta del zumo fortificado son las que tienen niveles basales más elevados de 25(OH)D. Nos podríamos preguntar si son los niveles descendidos de 25(OH)D los que favorecen la presencia de anemia o, si por el contrario, son los niveles bajos de hierro los que producen un déficit de vitamina D.

Azizi-Soleiman y cols [86] realizan en un reciente trabajo una excelente revisión sobre la influencia de la deficiencia de hierro sobre los niveles de vitamina D, y el efecto de los niveles de vitamina D sobre la deficiencia de hierro. Con respecto al mecanismo propuesto de la deficiencia de hierro sobre los niveles de vitamina D, postulan que la actividad de las enzimas que contienen hierro desciende. La 25-hidroxilasa

necesita el concurso de un citocromo P450, el CYP2R1, que contiene hierro. La 1- α -hidroxilasa necesita el concurso de la NADPH-citocromo P450 reductasa que a su vez necesita de la acción de la ferredoxina-reductasa y de la ferredoxina [101]. Ambas enzimas contienen el grupo hemo. Con respecto al mecanismo propuesto para que la vitamina D influya sobre los niveles de hierro estos autores concluyen: a) el hiperparatiroidismo debido a la deficiencia de vitamina D disminuye la proliferación de las células progenitoras eritroides [102]; b) la deficiencia en vitamina D está asociada con un aumento de los niveles de hepcidina, proteína relacionada con el metabolismo del hierro.

Azizi-Soleiman y cols [86] realizaron también una revisión sistemática sobre la relación entre la anemia por deficiencia de hierro y la deficiencia en vitamina D, y el efecto de la recuperación de los niveles de vitamina D a partir de la recuperación de los niveles de hierro. Partiendo de 938 artículos de la literatura se centraron finalmente en 23 que les resultaron relevantes. Estos autores concluyeron que la mayoría de los estudios confirman la existencia de una relación entre el hierro y la vitamina D, pero los datos que existen hasta la actualidad no apoyan el efecto beneficioso de una suplementación de hierro sobre un incremento de los niveles de vitamina D. Estos resultados coinciden con los presentados en esta tesis doctoral, en la que no observamos ningún incremento de los niveles de 25(OH)D de las mujeres premenopáusicas en estudio a pesar de la recuperación de los niveles de hierro tras la ingesta de la bebida fortificada con este mineral.

En relación con la influencia de la vitamina D sobre los niveles de hierro, Madar y cols [103] estudiaron el efecto de la suplementación con vitamina D sobre los niveles de ferritina, hemoglobina, hierro sérico y saturación de transferrina en una población de personas pertenecientes a minorías étnicas que vivían en Noruega. Recibieron 10 μ g o 20 μ g de vitamina D3 o placebo durante 16 semanas en invierno. Las conclusiones del trabajo muestran que no se produjo ninguna variación en los niveles de

hemoglobina ni en los otros marcadores del status del hierro tras la administración de vitamina D.

Como puede observarse en los resultados obtenidos en este trabajo, la ingesta del zumo fortificado con hierro produjo un aumento de hemoglobina, hierro sérico, ferritina y saturación de transferrina. La influencia de este zumo fortificado en hierro sobre los parámetros relacionados con este elemento ha sido descrita en un trabajo previo [21].

Dados los bajos niveles de 25(OH)D en la población de voluntarias, esperábamos encontrar niveles de PTH elevados sobre el rango normal. Sin embargo, los niveles de PTH de todas las participantes en el estudio eran normales tanto en situación basal como a las 16 semanas, al final del estudio.

En un reciente trabajo realizado por nuestro grupo [104], encontramos que niveles de 25(OH)D inferiores a 24 ng/ml producían hiperparatiroidismo secundario en un alto porcentaje de la población. Sin embargo, esto no ocurría en nuestro grupo de estudio. Una posible explicación de este hecho es que nuestra población estaba formada únicamente por mujeres jóvenes premenopáusicas.

Del mismo modo, en un estudio realizado en una población de universitarios en Gran Canaria [105] con un alto porcentaje de deficientes en vitamina D, no se observaba tampoco ningún caso de PTH por encima de los valores de normalidad.

Con respecto a la posible influencia del déficit de hierro o del déficit de vitamina D sobre la calidad ósea, no observamos ninguna variación en los niveles de los marcadores de remodelado óseo a lo largo del estudio. Ni los bajos niveles de vitamina D, ni la recuperación de los niveles de hierro parecen influir sobre el nivel de estos marcadores.

Con respecto a los niveles observados en estos marcadores, son algo más elevados que otros datos presentados en la bibliografía de mujeres premenopáusicas [106, 107]. Pero hay que tener en cuenta que estos datos están obtenidos en mujeres entre 30 y 45 años, y la edad media de nuestra población es de 25 años. Se conoce que los niveles del remodelado óseo están elevados hasta la madurez esquelética, que se puede considerar a los 30 años. Es por ello que resulte normal que los niveles de los marcadores de remodelado de nuestra población sean algo más elevados que los niveles de las mujeres entre 30 y 45 años.

De hecho, con unos niveles de PTH normales, eran de esperar unos niveles normales de marcadores de remodelado óseo.

Es muy importante el hecho de que ni la deficiencia de hierro ni el déficit de vitamina D hayan provocado un aumento de la PTH en nuestra población. Un aumento de la PTH conllevaría a un aumento del remodelado óseo con la consecuencia directa de una pérdida de masa ósea en este momento tan relevante en la vida en que todavía (hasta los 30 años) se está modelando el hueso y consiguiendo el pico máximo de masa ósea, que va a ser tan importante en el futuro a la hora de desarrollar una osteoporosis.

De hecho, hemos encontrado en la literatura diversos trabajos en que la deficiencia de vitamina D no afecta al remodelado óseo ni a la densidad mineral ósea, coincidiendo con nuestros resultados.

Garnero y cols [108] realizaron una interesante investigación en 669 mujeres postmenopáusicas relacionando los niveles de 25(OH)D con los de los marcadores de remodelado óseo, la densidad mineral ósea y la incidencia de fracturas. Los autores llegan a la conclusión de que el status de vitamina D de estas mujeres no es un determinante importante de la salud ósea.

En otro trabajo de Roy y cols [109], publicado en el mismo año que el anterior, se estudiaron a 78 mujeres jóvenes asiáticas (edad media 29.2

años) y se observó que sólo cuando el descenso de los niveles de 25(OH)D se producía por debajo de 15 ng/ml, este hecho venía asociado con una reducción progresiva de la masa ósea en la cadera y en la muñeca.

Los resultados de este trabajo son muy semejantes a los encontrados por Aguado y cols [110] en mujeres postmenopáusicas ambulatorias de una consulta de reumatología de Madrid. Solamente se observaba una relación entre concentraciones bajas de 25(OH)D y densidad mineral ósea cuando las concentraciones de vitamina D eran menores de 37 nmol/l (14 ng/ml), prácticamente un resultado igual al del trabajo anterior.

Con respecto a la asociación entre niveles de ferritina sérica y calidad del hueso, Lee y cols [111] observaron la relación entre la ferritina sérica y los niveles de densidad mineral ósea en 2943 sujetos coreanos de más de 65 años. Estos autores encontraron que los niveles de ferritina sérica se asociaban positivamente con los de densidad mineral ósea de la columna o el fémur en los hombres, pero no en las mujeres. Dado que nuestro trabajo se ha realizado en mujeres, esto podría explicar que no hayamos observado ninguna variación en los marcadores de remodelado óseo en nuestra población con niveles bajos de ferritina.

En conclusión, los marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea se han mantenido estables en nuestra población de voluntarias independientemente de su deficiencia de hierro. Estos resultados podrían explicarse porque nuestras voluntarias tenían deficiencia de hierro sin anemia y eran jóvenes, por lo que su formación ósea prevalecería sobre su resorción. Sin embargo, no puede descartarse que una deficiencia continuada de hierro pueda desembocar en una pérdida de masa ósea y en un riesgo aumentado de osteoporosis. En este sentido, un estudio en mujeres postmenopáusicas encontró que las mujeres osteoporóticas que habían sufrido una fractura presentaban menores niveles de hierro que las que no se habían fracturado [74]. Resultaría de gran interés investigar si la

deficiencia de hierro, mantenida durante años, podría predisponer a la osteoporosis.

Otro punto de extraordinaria importancia es que el mantenimiento de un status adecuado de hierro y de vitamina D es esencial para una salud integral. La deficiencia de hierro afecta a la actividad física y mental, inmunidad y regulación de la temperatura [112]. La deficiencia de vitamina D no se relaciona ya únicamente con el metabolismo del calcio y del fósforo sino que está relacionada con un riesgo incrementado de muchas enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones y enfermedades cardiovasculares [113]. Tengamos en cuenta que todas estas acciones extra-óseas de la vitamina D están relacionadas con las 1- α -hidroxilasas extra-renales, que dependen fundamentalmente de la cantidad de sustrato (25(OH)D) que existe en el tejido en cuestión, situaciones que no corrige el hiperparatiroidismo secundario como en el caso de la absorción de calcio. No hemos estudiado hasta qué punto los bajos niveles de 25(OH)D de nuestra población de voluntarias han podido afectar a su salud a través de las 1- α -hidroxilasas extra-renales.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. De un total de una población de 161315 mujeres entre 18 y 35 años atendidas en la Dirección Asistencial Centro entre 2010 y 2015, 6321 presentaban anemia ferropénica, de las cuales 3910 (cifra importante) no presentaban procesos concomitantes que justificasen esa patología.
2. El consumo durante 4 meses de una bebida fortificada en hierro produjo en nuestras voluntarias (mujeres entre 18 y 35 años con ferropenia) un aumento significativo de los niveles de hierro, hemoglobina, ferritina sérica y saturación de transferrina.
3. Los niveles de 25(OH)D encontrados en las voluntarias fueron menores de los de la población normal. A pesar de la recuperación de los marcadores del metabolismo del hierro tras la ingesta del zumo fortificado, los niveles de 25(OH)D de las mujeres estudiadas no experimentaron ninguna mejora e incluso descendieron a lo largo del experimento, posiblemente por la época del año en que se realizó.
4. A pesar de los bajos niveles de 25(OH)D no se observó un aumento de los niveles de PTH de las voluntarias, que no variaron a lo largo del estudio. Los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo eran normales en todos los casos y no se vieron afectados por la ingesta de hierro.

5. Este trabajo parece demostrar que la ferropenia no afecta al metabolismo del hueso a nivel de PTH ni de remodelado óseo. Se necesitarían más estudios para conocer si sucede lo mismo en el caso de la anemia ferropénica.
6. El hecho de que la ferropenia y los bajos niveles de vitamina D no parezcan afectar al metabolismo del hueso en estas voluntarias no descarta que pueda afectar a otros aspectos de su salud (aspectos no estudiados en esta tesis), si tenemos en cuenta las posibles acciones extrarrenales de la vitamina D, puesto que tendríamos un déficit de sustrato.
7. A pesar de que la ingesta de hierro no parece afectar a los niveles de vitamina D, el aumento en la saturación de transferrina fue significativamente mayor en aquellas voluntarias cuyos niveles basales de 25(OH)D eran superiores a 50 nmol/l (20 ng/ml).
8. Como médico de Atención Primaria, tras realizar este trabajo, animaría a firmas como Leche Pascual u otras similares a que lanzaran al mercado un zumo de estas características puesto que es mucho mejor tolerado a nivel digestivo que el tratamiento farmacológico habitual. Además, las características del zumo hacían que fuera del agrado de las voluntarias.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* 12(4):444-454.
2. Vaquero MP, Blanco-Rojo R, Toxqui L (2012). Nutrición y anemia. Manual Práctico de Nutrición y Salud de Kelloggs. A. Carbajal, C. Martinez-Roldan. Madrid, Exlibris ediciones: 367-376.
3. WHO (2008). Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia. Ginebra, Suiza, World Health Organization.
4. Pasricha SR, Flecknoe-Brown SC, Allen KJ, Gibson PR, McMahon LP, Olynyk JK, et al. (2010). Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update. *Med J Aust.* 193(9):525-532.
5. WHO (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Ginebra, Suiza, World Health Organization.
6. Strong J (2010). Hematinic deficiencies. The Obstetric Hematology Manual. S. Pavord, B. Hunt. New York, Cambridge University Press:13-21.
7. Milman N, Kirchhoff M (1992). Iron stores in 1359, 30- to 60-year-old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Ann Hematol.* 64(1):22-27.
8. Milman N, Kirchhoff M, Jorgensen T (1992). Iron status markers, serum ferritin and hemoglobin in 1359 Danish women in relation to menstruation, hormonal contraception, parity, and postmenopausal hormone treatment. *Ann Hematol.* 65(2):96-102.

9. Milman N, Clausen J, Byg KE (1998). Iron status in 268 Danish women aged 18-30 years: influence of menstruation, contraceptive method and iron supplementation. *Ann Hematol.* 77(1-2):13-19.
10. Hallberg L, Hogdahl AM, Nilsson L, Rybo G (1966). Menstrual blood loss--a population study. Variation at different ages and attempts to define normality. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 45(3):320-351.
11. Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB (2000). Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. British Society of Gastroenterology. *Gut.* 46 Suppl 3-4:IV1-IV5.
12. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D (2008). Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur J Appl Physiol.* 103(4):381-391.
13. Alexander D, Ball MJ, Mann J (1994). Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur J Clin Nutr.* 48(8):538-546.
14. Allen RP, Auerbach S, Bahrain H, Auerbach M, Earley CJ (2013). The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol.* 88(4):261-4.
15. Osaki T, Ueta E, Arisawa K, Kitamura Y, Matsugi N (1999). The pathophysiology of glossal pain in patients with iron deficiency and anemia. *Am J Med Sci.* 318(5):324-9.
16. Trost LB, Bergfeld WF, Calogeras E (2006). The diagnosis and treatment of iron deficiency and its potential relationship to hair loss. *J Am Acad Dermatol.* 54(5):824-44.
17. Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci.* 17(3):119-123.
18. Zimmermann MB, Hurrell RF (2007). Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 370(9586):511-520.
19. Cook JD (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 18(2):319-332.

20. Hurrell R (2002). How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutr Rev.* 60(7 Pt 2): S7-15; discussion S43.
21. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP (2011). Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr.* 105(11):1652-1659.
22. Hurrell RF (2002). Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr.* 132(4 Suppl):806S-812S.
23. Wegmuller R, Zimmermann MB, Moretti D, Arnold M, Langhans W, Hurrell RF (2004). Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J Nutr.* 134(12):3301-3304.
24. Zimmermann MB (2004). The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 74(6):453-461.
25. Wegmuller R, Camara F, Zimmermann MB, Adou P, Hurrell RF (2006). Salt dual-fortified with iodine and micronized ground ferric pyrophosphate affects iron status but not hemoglobin in children in Cote d'Ivoire. *J Nutr.* 136(7):1814-1820.
26. WHO / FAO, Ed. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations.
27. Hewison M, Freeman L, Hughes S, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al (2003). Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 170(11):5382-90.
28. Rapado Errazti, A (2000). Metabolismo de la vitamina D. En: Rapado Errazti, A.; Díaz Curiel, M. (editores). *Hipovitaminosis D en España*. Madrid: FHOEMO, p. 1-13.

29. Holick, M.F. Vitamina D. En: Shills, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C (2002a). Nutrición en salud y enfermedad. 9ª edición. Mexico: McGraw-Hill Interamericana editores, (1): 381-399.
30. Le Grusse, J.; Watier, B (1993). Vitamine D. En: Le Grusse, J.; Watier, B. Les vitamines. Neuilly-Sur-Seine Cedex: Centre d'étude et d'information sur les vitamines (CEIV), p. 57-79.
31. Traba ML, De la Piedra C, Babé M, Climent P (1987). Vitamina D: Metabolismo, acciones y estados patológicos. Roche, Madrid: 13-29.
32. Norman AW, Litwack F (1997). Hormones. Academic Press, San Diego, Londres. p.72-76.
33. Rao DS. Perspective on assessment of vitamin D nutrition (1999). J Clin Densitom 2;247-264
34. Hawkins F (2007). La vitamina D y el hueso. Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas 16:45-47.
35. Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Coates PS, Horowitz M, Nordin BE (2008). Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. J Bone Miner Res 23(11):1859-1863.
36. Torrubia B, Alonso I, Lopez-Ramiro E, Mahillo I, De la Piedra C (2016). Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH) vitamina D. Rev Osteoporos Metab Miner. 8(2):70-74.
37. Hawkins F, Martínez Díaz Guerra G (2000). Enfermedades de la glándula paratiroides. En: Medicina Interna. Editor C Farreras-Rozman . Elsevier, Madrid p.2090-2100.
38. Holick MF (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. Am J Clin Nutr. 79(3):362-371.
39. Bikle DD (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Chem Biol. 21(3):319-329.
40. Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS (2015). Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques,

- limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev.* 34(1):2-23.
41. DeLuca HF (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 80(6 Suppl):1689S-1696S.
 42. Aguado P, Quesada M (2006) En A. Díez (Presidencia), Más allá en el tratamiento de la osteoporosis. Simposio llevado a cabo en Barcelona, España.
 43. Sorensen OH, Lund B, Saltin B, Andersen RB, Hjorth L, Melsen F, Mosekilde L (1979). Myopathy in bone loss of ageing: improvement by treatment with 1 alpha-hydroxycholecalciferol and calcium. *Clin Sci (London)* 56(2):157-61.
 44. Holick MF (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 357(3):266-281.
 45. Aguado P et al (2004). Guía de buena práctica en Geriatria. Osteoporosis. Sociedad Española de Reumatología.
 46. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD (2000). Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 15: 1526-1536.
 47. Holick MF, Chen TC (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 87(4):1080S-1086S.
 48. Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gomez JM (2008), Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24, 25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem.* 41(9):676-680.
 49. Rodriguez Sangrador M, Beltran de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O (2010). [Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project)]. *Nutr Hosp.* 25(5):755-762.

50. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Zazo P, de la Piedra C, Vaquero MP (2013). Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food. *Eur J Nutr.* 52(2):695-703.
51. Gonzalez-Molero I, Morcillo S et al. (2011). Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 65(3):321-328.
52. Manson JE, Brannon PM, Rosen CJ, Taylor CL (2016). Vitamin D Deficiency-Is there really a pandemic? *N Engl J Med.* 375:1817-1820.
53. Riancho JA y Gonzalez-Macias J, Editores (2004). Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo Editores.
54. Garnero P, Delmas PD (1993). Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrin Metab* 77: 1046-1053.
55. Domínguez C, Sosa M, Traba ML, Alvarez E, De la Piedra C (1998). Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 8: 147-151.
56. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD (1996). Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11: 337-349.
57. Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, Mazzaferro S, Ruso R, Cozzolino M (2013). Renal anemia and EPO hiporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 28:1672-1679.
58. Davis SL, Littlewood TJ (2012). The investigation and treatment of secondary anemia. *Blood Rev* 26: 65-71.
59. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M (2009). 25-hydroxyvitaminD deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 30: 64-72.

60. Lopez-Ramiro E, Rubert M, Gonzalez-Parra E, Mahillo I, de la Piedra C (2016). Correlación entre niveles de 25(OH)vit D y grado de anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Rev Osteoporos Metab Miner* 8(3):25.
61. Nagaku M, Eckardt KU (2006). Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 26: 261-268.
62. Patel NM, Gutierrez OM, Andress DL, Coyne DW, Levin A, Wolf M. Vitamin D deficiency and anemia in early chronic kidney disease. *Kidney International* 2010; 77:715-720.
63. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989). The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 320: 980-991.
64. Norman AW (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147: 5542-5548.
65. Sim J, Lac PT, Liu ILA, Megerditchian SO, Kumar V, Kujubu DA et al. (2010). Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 89: 447-452.
66. Lac PT, Choi K, Liu IA, Meguerditchian S, Rasgon SA, Sim JJ (2010). The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. *Clinical Nephrology* 74: 25-32.
67. Babit JL, Lin HY (2010). Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 55: 726-741.
68. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78(4):1193-1231.
69. Knott L, Bailey AJ (1998) Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22(3):181-187.
70. Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006). Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(10):2547-2550

71. Parelman M, Stoecker B, Baker A, Medeiros D (2006). Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 231(4):378-386.
72. Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, Ojeda ML, Lopez-Aliaga I (2011). Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr* 51(2):241-247.
73. Ilich-Ernst JZ, McKenna AA, Badenhop NE, Clairmont AC, Andon MB, Nahhas RW, Goel P, Matkovic V (1998). Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. *Am J Clin Nutr* 68(4):880-887.
74. D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, Grimaldi A, Gennero L, Gariboldi A, Ponzetto A, Pescarmona GP, Isaia GC (2008). Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone* 43(6):1010-1015.
75. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, et al. (2009). Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española (Recommended intakes of energy and nutrients for the Spanish population). In *Tablas de composición de alimentos (Food Compositions Tables)*, 13th ed., pp. 227-230. Madrid: Pirámide, Grupo Anaya, SA.
76. Institute of Medicine and Food and Nutrition Board (2001) *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC: National Academic Press.
77. De Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG (1996). Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA study. *Eur J Clin Nutr* 50(Suppl 2): S123-S124.

78. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP (2009). An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr* 102(4):546-553.
79. DIAL (2010) Alce Ingenieria, España.
80. Palacios C, Gonzalez L (2014). Is Vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol* 144(Pt A):138-45.
81. Arnalich F, Rodriguez D, Gomez J (1996). Orientación diagnóstica y pautas de tratamiento de las anemias y estados ferropénicos. *Farmacoterapia* XII(6):298-304.
82. Coutard A, Garlatézec R, Estivin S, Andro M, Gentric A (2013). Association of Vitamin D deficiency and anemia in a hospitalized geriatric population: Denutrition as a confounding factor. *Ann Hematol* 92:615-619.
83. Jin HJ, Lee JH, Kim MK (2013). The prevalence of Vitamin D deficiency in iron-deficient and normal children under the age of 24 months. *Blood Res* 48:40-45.
84. Kang YS, Kim JH, Ahn EH, Yoo EG, Kim MK (2015). Iron and Vitamin D status in breastfed infants and their mothers. *Korean J Pediatr* 58:283-287.
85. Yoo EH, Cho HJ (2015). Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in Korean patients with anemia. *J Clin Lab Anal* 29:129-134.
86. Azizi-Soleiman F, Vafa M, Abiri B, Safavi M (2016). Effects of Iron on Vitamin D Metabolism: A Systematic Review. *Int J Prev Med* 7:126.
87. Heldenberg D, Tenenbaum G, Weisman Y (1992). Effect of iron on serum 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D concentrations. *Am J Clin Nutr* 56:533-536.
88. Iguchi A, Kazama JJ, Yamamoto S, Yoshita K, Watanabe Y, Iino N, et al (2015). Administration of ferric citrate hydrate decreases circulating FGF23 levels independently of serum phosphate levels in hemodialysis patients with iron deficiency. *Nephron* 131:161-166.

89. Prats M, Font R, García C, Cabré C, Jarrod M, Vea AM (2013). Effect of ferric carboxymaltose on serum phosphate and C-terminal FGF23 levels in non-dialysis chronic kidney disease patients: *Post-hoc* analysis of a prospective study. *BMC Nephrol* 14:167.
90. Toxqui L, Perez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, de la Piedra C, Vaquero MP (2014). Low iron status as a factor of increased bone resorption and effects of an iron and Vitamin D-fortified skimmed milk on bone remodelling in young Spanish women. *Eur J Nutr* 53:441-448.
91. Wolf M, Koch TA, Bregman DB (2013). Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res* 28:1793-1803.
92. Wright I, Blanco-Rojo R, Fernández MC, Toxqui L, Moreno G, Pérez-Granados AM, et al (2013). Bone remodelling is reduced by recovery from iron-deficiency anaemia in premenopausal women. *J Physiol Biochem* 69:889-896.
93. Valero MA, Hawkins F (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Rev Esp Enf Metab Óseas* 16:63-70.
94. Groba MV, Mirallave A, Gonzalez Rodriguez E, Garcia Santana S, Gonzalez Padilla E, Saavedra P, Soria A, Sosa M (2010). Factors related to vitamin D deficiency in medical students in Gran Canaria. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2:11-18.
95. Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, Lorenzo H, Polanco I, Quiles J, Romero de Avila MD, Russolillo G, Villarino A, Alfredo Martinez J (2009). Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp* 24(4):384-414.
96. Mesias M, Seiquer I, Navarro MP (2011). Calcium nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(3):195-209.

97. McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, Cooke R, Carapetis JR (2007). High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child* 92(12):1088-1093.
98. Grindulis H, Scott PH, Belton NR, Wharton BA (1986). Combined deficiency of iron and vitamin D in Asian toddlers. *Arch Dis Child* 61(9):843-848.
99. Shama S, Jain R, Dabla PK (2015). The Role of 25-Hydroxy Vitamin D Deficiency in Iron Deficient Children of North India. *Indian J Clin Biochem.* 30(3):313-317.
100. Monlezun DJ, Camargo CA Jr, Mullen JT, Quraishi SA (2015). Vitamin D Status and the Risk of Anemia In Community-Dwelling Adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006. *Medicine (Baltimore)* 94(50):e1799.
101. Jones G, Prosser DE (2011). The activating enzymes of Vitamin D metabolism (25-and 1 α -hydroxylases) In: Feldman D, Pike JW, Adams AJ, editors. *Vitamin D*. 3rd ed. New York: Elsevier. pp. 23-42.
102. Downs SH, Black N (1998). The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. *J Epidemiol Community Health.* 52:377-384.
103. Madar AA, Stene LC, Meyer HE, Brekke M, Lagerl v P, Knutsen KV (2016). Effect of vitamin D3 supplementation on iron status: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial among ethnic minorities living in Norway. *Nutr J* 15(1):74.
104. Lopez-Ramiro E, Rubert M, Mahillo I, de la Piedra C (2016). Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner* 8(2):55-60.
105. Gonzalez-Padilla E, Soria Lopez A, Gonzalez-Rodriguez E, Garcia-Santana S, Mirallave A, Groba MV, Saavedra P, Quesada JM, Sosa

- M (2011). High prevalence of hypovitaminosis D in medical students in Gran Canaria, Canary Islands (Spain). *Endocrinol Nutr* 58(6):267-273.
106. Ardawi MS, Maimani AA, Bahksh TA, Rouzi AA, Qari MH, Raddadi RM (2010). Reference intervals of biochemical bone turnover markers for Saudi Arabian women: a cross-sectional study. *Bone* 47(4):804-814.
 107. Del Campo MT, Gonzalez-Casaus ML, Aguado P, Bernad M, Carrera F, Martinez ME (1999). Effects of age, menopause and osteoporosis on free, peptide-bound and total pyridinium cross-link excretion. *Osteoporos Int* 9(5):449-454.
 108. Garnero P, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD (2007). Associations of vitamin D status with bone mineral density bone turnover, bone loss and fracture risk in healthy postmenopausal women. The OFELY study. *Bone* 40:716-722.
 109. Roy DK, Berry JL, Pye SR, Adams JE, Swarbrick CM, King Y, Silman AJ, O'Neill TW (2007). Vitamin D status and bone mass in UK South Asian women. *Bone* 40:200-204.
 110. Aguado P, del Campo MT, Garces MV, Gonzalez-Casaus ML, Bernad M, Gijon-Baños J, Martin Mola E, Torrijos A, Martinez ME (2000). Relación entre las concentraciones bajas de vitamina D y la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas ambulatorias de una consulta de reumatología de Madrid, España. *Osteoporosis Int* 11:739-744.
 111. Lee KS, Jang JS, Lee DR, Kim YH, Nam GE, Han BD, Do Han K, Cho KH, Kim SM, Choi YS, Kim DH (2014). Serum ferritin levels are positively associated with bone mineral density in elderly Korean men: the 2008-2010 Korea National Health and Nutrition Examination Surveys. *J Bone Miner Metab* 32(6):683-690.

112. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP (2010). Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 25(3):350-365.
113. Rojas-Rivera J, de la Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J (2010). The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 25(9):2850-2865.

PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR

Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food

Ruth Blanco-Rojo · Ana M. Pérez-Granados ·
Laura Toxqui · Pilar Zazo · Concepción de la Piedra ·
M. Pilar Vaquero

Received: 25 January 2012 / Accepted: 2 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Background Iron and vitamin D deficiencies are two of the most widespread nutritional disorders in the world. Our aim was to know whether the consumption of an iron-fortified fruit juice modifies bone remodelling and the possible influence of baseline vitamin D status on the recovery of iron status in a group of iron-deficient women. **Methods** Iron biomarkers, 25-hydroxyvitamin D levels and dietary intake were measured in 123 iron-deficient menstruating women. A subgroup ($n = 41$) participated in a randomised double-blind placebo-controlled study of 16-weeks during winter. They consumed a placebo fruit juice (P) or iron-fortified fruit juice (F). Dietary intake, 25-hydroxyvitamin D, parathormone (PTH), bone alkaline phosphatase (ALP), aminoterminal telopeptide of collagen I (NTX) and iron biomarkers were determined.

Results Ninety-two per cent of the iron-deficient women were vitamin D deficient or insufficient. Transferrin saturation and 25-hydroxyvitamin D were positively correlated. Iron status improved in F, 25-hydroxyvitamin D decreased in F and P, and PTH, ALP and NTX levels were within the normal range and did not vary. Women with 25-hydroxyvitamin D ≥ 50 nmol/L compared with 25-hydroxyvitamin D < 50 nmol/L showed a higher increase in

transferrin saturation (a marker of iron supply to tissues) during iron recovery.

Conclusion The prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency is very high in iron-deficient women. The recovery of iron status by consuming an iron-fortified food does not affect 25-hydroxyvitamin D levels; however, the increase in iron supply to tissues is lower if the women also present vitamin D deficiency. Although bone health does not seem to be affected in this group of women, correction of iron and vitamin D deficiencies should be promoted in young women to improve present and future health.

Keywords Iron deficiency anaemia · 25-hydroxyvitamin D · Bone remodelling · Fortified food · Menstruating women

Introduction

Iron deficiency anaemia and vitamin D deficiency are extremely common and widespread nutritional disorders in the world [1, 2]. Some studies have been suggested a relationship between iron deficiency and low 25-hydroxyvitamin D levels [3–5]. Nevertheless, there are no reports regarding the effect that the combined presence of these two deficiencies could have on bone metabolism.

The relationship between these two deficiencies is not clear, but seems to be reciprocal. On the one hand, clinical observations suggest a role of 1,25-dihydroxyvitamin D [6] in erythropoiesis, as this hormone directly stimulates erythroid precursors [7]. On the other hand, iron participates in the second activation step of vitamin D, necessary to make this hormone functional. This conversion is done by a renal 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase (1 α -OHase) enzyme that comprises a cytochrome P-450, a ferredoxin and a

R. Blanco-Rojo · A. M. Pérez-Granados · L. Toxqui ·
M. P. Vaquero (✉)
Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food
Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish
National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain
e-mail: mpvaquero@ictan.csic.es

P. Zazo · C. de la Piedra
Department of Biochemistry Investigation, Fundación Jiménez
Díaz Institute for Medical Research (IIS-FJD), Madrid, Spain

ferredoxin reductase [8]. Therefore, less available iron could compromise production of the active form of vitamin D.

With respect to the effect that these deficiencies could have on bone metabolism, the role of vitamin D in mineralising the skeleton by increasing serum calcium concentrations is well known [9]. Vitamin D deficiency is associated with rickets in children and osteomalacia in adults and a higher risk of osteoporosis [1]. Iron is essential in collagen synthesis since it is a required cofactor for the prolyl and lysyl hydroxylases. These enzymes act on the nascent peptide chain prior to triple helix formation, and the reaction products serve to stabilise the collagen triple helices under physiological conditions [10]. It is hypothesised that in an iron deficiency situation, there may be less iron available to the prolyl and lysyl hydroxylases which could result in decreased cross-linking activity and, subsequently, weaker collagen fibres. In fact, severe iron deficiency anaemia has been associated with deleterious effects on bone in rats. Previous studies showed that iron-deficient anaemic rats had lower bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD) and mechanical strength than iron-replete animals [11–13].

In humans, few studies are available, and the results are less consistent. A trend for positive association between bone mineral density of the radius and serum ferritin was found in adolescent girls [14]. One study carried out in postmenopausal women showed that osteoporotic women with fractures presented a relative iron deficiency compared with controls [15]. Therefore, women who suffer from iron deficiency during decades may develop osteoporosis later in life. However, there is no information on bone metabolism in iron-deficient menstruating women and the possible changes in bone turnover during iron status recovery.

Consumption of iron-supplemented foods can be useful to prevent iron deficiency anaemia. In this sense, iron-enriched fruit juices have recently been found to be very efficacious at improving iron status in young iron-deficient women [16] which was attributed to the amount of iron in the juice, the presence of iron absorption enhancers, such as ascorbic acid, and absence of inhibitors.

The present study was carried out in iron-deficient menstruating women in order to know: (1) if there is a relationship between 25-hydroxyvitamin D levels and iron status biomarkers; (2) if consumption of an iron-fortified fruit juice that improves iron status modifies bone remodelling; and (3) if the recovery of iron status by consuming this iron-fortified food varies depending on baseline vitamin D status.

This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01135576.

Subjects and methods

Subjects

A group of 123 women was recruited during winter season. The inclusion criteria were as follows: women aged 18–35 years, non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding, with low iron stores, defined as serum ferritin < 40 ng/mL and haemoglobin \geq 11 g/dL. Subjects were excluded from the study if they had amenorrhoea, menopause or any known health problems likely to influence iron status including iron-metabolism-related diseases (iron deficiency anaemia, thalassaemia, haemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, coeliac disease, haemorrhagic diseases), renal disease or allergy to any of the components of the assay juices. Other exclusion criteria were as follows: blood donors or to have regularly consumed iron supplements within the 4 months prior to participating in the intervention.

The participants signed a written informed consent to a protocol approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, and the Spanish National Research Council Committee, Madrid, Spain.

Nutritional intervention

A subgroup of the aforementioned volunteers selected at random ($n = 41$) participated in a randomised double-blind placebo-controlled study of 16 weeks of duration, from November to March. Two groups: P group ($n = 18$) or F group ($n = 23$) consumed 500 mL/day of placebo fruit juice or iron-fortified fruit juice, respectively. The fortified juice supplied 18 mg of iron per 500 mL carton, in the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to 100 % of the recommended dietary allowance (RDA) per day [17], and all juices were fortified with vitamin C. Details of the nutritional composition of the juices and conditions of the study were reported previously [16]. At baseline, 8- and 16-week blood samples and 24-h urine samples were collected and stored at -80°C for analytical determination.

Each subject's dietary intake was evaluated at baseline and every 8 weeks to control any possible changes in energy and nutrient intake. They completed a 72-h detailed dietary intake report, previously validated and proved valuable to assess nutrient intake [18, 19], specifying the types of food consumed and serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake and energy provided by macronutrients were calculated with a computer application using the Spanish Food Composition Database [20].

Blood sampling and biochemical assays

Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting period, between 0800 hours and 0900 hours. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1,000 g for 15 min and stored at -80°C .

Total red blood cells, haematocrit, mean corpuscular volume (MCV) and haemoglobin were determined following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Transferrin saturation (%) was calculated as follows: serum iron ($\mu\text{mol/L}$)/TIBC ($\mu\text{mol/L}$) \times 100, where TIBC is total iron-binding capacity, calculated as $25.1 \times$ transferrin (g/L).

Serum 25-hydroxyvitamin D (25-hydroxyvitamin D₂ plus 25-hydroxyvitamin D₃) was determined using an ELISA technique (25-hydroxyvitamin D EIA, IDS, UK). The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were 5.6 and 6.4 %, respectively. Sensitivity of the method is 2 ng/mL. Deficient vitamin D status was defined as a circulating 25-hydroxyvitamin D concentration < 50 nmol/L (< 20 ng/mL), insufficient status was considered 51–74 nmol/L (21–29 ng/mL) and sufficient > 75 nmol/L (> 30 ng/mL) [1].

Also, biochemical markers of bone turnover and PTH were only determined during the nutritional intervention. As a marker of bone formation, serum isoenzyme of bone alkaline phosphatase (ALP) was quantified with an ELISA technique (Ostase[®]Bap, IDS, UK) using two monoclonal antibodies specific for bAP over liver AP. The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Sensitivity of the method is 7 $\mu\text{g/L}$. Intra- and inter-assay coefficients of variation are 4.5 and 6.1 %, respectively. Normal range: 3–15 $\mu\text{g/L}$. The biochemical marker of bone resorption, aminoterminal telopeptide of collagen I (NTX) was determined in 24-h urine pool by an ELISA test (Osteomark[®]NTx Urine, Wampole Laboratories, USA). The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Sensitivity of the method is 1 nM of bone collagen equivalents (BCE). Intra- and inter-assay coefficients of variation are 5 and 5.5 %, respectively. Normal range: 15–80 nM BCE/mM creatinine. PTH was determined by chemiluminescence assay of second generation PTH (Elecsys, Roche Diagnostics, USA). Intra- and inter-assay coefficients are 2.7 and 6.5 %, respectively, and normal range is 15–65 pg/mL. Normal ranges of ALP, NTX and PTH for healthy women (30–45 years old) were estimated at the Fundación Jiménez Díaz Institute for Medical Research (IIS-FJD), Madrid, Spain.

Statistical analysis

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. Serum ferritin values were log transformed for statistical testing. Pearson's linear correlation tests between serum 25-hydroxyvitamin D levels and iron biomarkers at baseline were performed.

In the nutritional intervention data, repeated-measures ANOVA and post hoc Bonferroni test were used to study time effect within groups. Comparisons were also made between the F group and the P group using ANOVA. To know whether the recovery of iron status after consuming this iron-fortified food varies depended on baseline vitamin D status, a two-way repeated-measures ANOVA with 25-hydroxyvitamin D levels (< 50 nmol/L and ≥ 50 nmol/L) as the between-subjects factor was applied for each parameter in P and F group. Comparisons between volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L and volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L at each point were measured using ANOVA. $p < 0.05$ was considered significant. The SPSS statistical package for Windows (version 19.0) was used to analyse the data.

Results

Table 1 shows the baseline characteristics of the subjects. No significant differences between the total group and the subgroup that participated in the nutritional intervention were found. In this group of iron-deficient women ($n = 123$), 42.3 % presented vitamin D deficiency, 49.6 % vitamin D insufficiency and 8.1 % vitamin D sufficient. There was a significant positive correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and transferrin saturation ($p = 0.007$), but the correlations between serum 25-hydroxyvitamin D and haemoglobin, serum ferritin and serum transferrin were not significant.

Dietary characteristics of the total group are presented in Table 2. No significant associations between nutrient intake and 25-hydroxyvitamin D levels and iron parameters were found.

Table 3 shows energy and nutrient intakes at baseline and week 16 of iron-deficient women consuming placebo or iron-fortified fruit juices. Although energy intake did not show significant differences between baseline and week 16 in either groups, a decrease in the energy percentage from proteins ($p = 0.02$ in P group) and a trend towards increase in that from carbohydrates were observed during the study. At baseline, there was no difference in iron intake between both groups, but for the duration of the intervention, due to the consumption of the iron-fortified juice, iron intake was approximately double in F group compared with P group.

Table 1 Iron biomarkers and 25OH vitamin D of the total group and the subgroup of volunteers

	Total group (<i>n</i> = 123)	Subgroup (<i>n</i> = 41)
Age (years)	24.3 ± 4.8	25.5 ± 5.9
Body mass index (kg/m ²)	21.7 ± 2.2	21.8 ± 2.3
Haemoglobin (g/dL)	13.2 ± 0.9	13.2 ± 0.8
Serum ferritin (ng/mL)	26.4 ± 17.5	22.6 ± 12.2
Serum transferrin (mg/dL)	314.5 ± 60.5	318.6 ± 53.8
Transferrin saturation (%)	19.3 ± 9.2	17.1 ± 7.7
25-hydroxyvitamin D (nmol/L)	54.2 ± 18.0	50.2 ± 14.0
% Deficient vitamin D status (<50 nmol/L)	42.3	53.6
% Insufficient vitamin D status (51–74 nmol/L)	49.6	41.5
% Sufficient vitamin D status (>50 nmol/L)	8.1	4.9

Differences between groups were not significant. Data are mean ± SD

Table 2 Energy and macronutrient intakes of iron-deficient women

Energy (kJ/day)	9,091 ± 2,512
Protein (% energy/day)	14.6 ± 4.2
Carbohydrate (% energy/day)	41.8 ± 13.0
Lipids (% energy/day)	40.2 ± 13.4
Iron (mg/day)	14.1 ± 4.7
Calcium (mg/day)	977.5 ± 355.8
Magnesium (mg/day)	283.8 ± 87.9
Phosphorus (mg/day)	1,423 ± 363
Vitamin D (µg/day)	3.0 ± 2.4
Vitamin C (mg/day)	131.2 ± 60.8
Vitamin K (µg/day)	134.0 ± 89.6

Data are mean ± SD (*n* = 123)

Vitamin C intake increased in both groups from baseline, due to juice composition, without significant differences between P and F groups. There were no changes in the other nutrient intakes determined.

Table 4 shows the results of iron and bone biomarkers of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks. In F group, significant increases in haemoglobin, serum ferritin and transferrin saturation levels and decreases in serum transferrin levels, show recovery from iron deficiency ($p = 0.03$, $p < 0.001$, $p = 0.008$, $p < 0.001$, respectively), and compared with P group haemoglobin, serum ferritin levels were significantly higher at week 16 ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). Serum 25-hydroxyvitamin D significantly decreased from baseline to the end of the study in P and F ($p < 0.001$), without differences between groups. No changes were observed in PTH, ALP and NTX in P or F group.

Transferrin saturation did not change during the experimental period in the P group. Figure 1 shows transferrin saturation increase in volunteers of F group depending on baseline 25-hydroxyvitamin D levels (time influence, $p = 0.008$, time × 25-hydroxyvitamin D level, NS). Transferrin saturation was significantly higher in the F subgroup with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L compared with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L at 8 and 16 weeks ($p = 0.05$ and $p = 0.04$, respectively).

Discussion

Present results show for the first time a relationship between iron deficiency anaemia and vitamin D deficiency in menstruating Spanish women. A positive association between 25-hydroxyvitamin D and transferrin saturation was observed in these women. The best marker of vitamin D status is 25-hydroxyvitamin D, while transferrin saturation is the marker of the supply of iron to tissues. Recovery of transferrin saturation, due to the consumption of an iron-fortified fruit juice, was found to be lower if the iron-deficient women had also vitamin D deficiency.

It is remarkable that the majority (92 %) of the women who participated in the study were vitamin D deficient or insufficient, and this percentage is higher than data of hypovitaminosis D described for Spanish adolescent women (63 %) [21] and Spanish young adults (61 %) [22]. Therefore, this suggests that there is an association between the deficiencies of both micronutrients in our population.

There are many different factors that could independently influence the development of these two deficiencies in this population group, such as nutritional, genetic, physiological and environmental factors. Concerning dietary intake at baseline (Table 2), iron and vitamin D intakes were below the Recommended Dietary Allowance (RDA) for this population group (18 mg/day and 5 µg/day, respectively) [23, 24]. Regarding iron intake, the RDA is not easily reached by menstruating women, as previously reported by our research group [25, 26]. Although the influence of dietary components on iron absorption is well known [27], in the present study, no association between nutrient intake and iron biomarkers was found. However, the increase in iron intake due to the consumption of the iron-fortified fruit juice clearly improved iron status, showed by the increasing in haemoglobin, ferritin and transferrin saturation. The influence of this iron pyrophosphate-fortified fruit juice on other iron parameters was detailed in a recent article [16]. Few foods naturally contain vitamin D, so a deficient intake is generally observed in the general population [28]. In agreement with this, vitamin D intake in the present study only reached 60 % of the RDA. The lack of association between dietary vitamin

Table 3 Energy and nutrient intakes of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks

	Group	Baseline	Week 16	<i>p</i> time
Energy (kJ/day)	Placebo	9,087 ± 2,282	10,420 ± 2,846	NS
	Fortified	8,477 ± 1,816	9,571 ± 2,489	NS
Protein (% energy/day)	Placebo	14.9 ± 2.6	13.3 ± 1.8	0.02
	Fortified	14.1 ± 2.4	13.5 ± 2.3	NS
Carbohydrate (% energy/day)	Placebo	38.7 ± 7.7	42.7 ± 8.3	NS
	Fortified	42.5 ± 5.8	43.9 ± 6.6	NS
Lipids (% energy/day)	Placebo	42.5 ± 7.7	39.3 ± 7.0	NS
	Fortified	39.9 ± 6.05	39.0 ± 6.2	NS
Iron (mg/day)	Placebo	15.6 ± 5.5	14.0 ± 5.5	NS
	Fortified	13.1 ± 3.5	32.1 ± 9.1***	<0.001
Calcium (mg/day)	Placebo	1,044 ± 380	1,003 ± 412	NS
	Fortified	905 ± 262	834 ± 310	NS
Magnesium (mg/day)	Placebo	266.8 ± 109.6	275.1 ± 92.1	NS
	Fortified	267.2 ± 49.4	262.2 ± 95.3	NS
Phosphorus (mg/day)	Placebo	1,361.6 ± 348.9	1,472.0 ± 509.6	NS
	Fortified	1,271.2 ± 273.9	1,321.6 ± 470.2	NS
Vitamin D (µg/day)	Placebo	2.7 ± 2.2	3.7 ± 2.7	NS
	Fortified	3.1 ± 2.5	3.9 ± 3.3	NS
Vitamin C (mg/day)	Placebo	136.3 ± 62.0	200.6 ± 60.4	<0.001
	Fortified	122.5 ± 49.1	206.2 ± 81.7	<0.001
Vitamin K (µg/day)	Placebo	159.6 ± 148.4	151.0 ± 84.0	NS
	Fortified	117.8 ± 63.9	147.1 ± 149.3	NS

Values are presented as means with their standard deviations (*n* = 41). Time-point differences were analysed by repeated-measures ANOVA. Comparisons between placebo group and fortified group at each point were measured using one-sided tests (****p* ≤ 0.001)

Table 4 Iron and bone biomarkers of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks

	Group	Baseline	Week 8	Week 16	<i>p</i> time
Haemoglobin (g/dL)	Placebo	13.0 ± 0.8 ^a	13.4 ± 0.8 ^b	13.1 ± 0.7 ^a	0.02
	Fortified	13.3 ± 0.9 ^a	13.7 ± 0.9 ^{ab}	13.7 ± 0.7 ^{b**}	0.03
Serum ferritin (ng/mL)	Placebo	22.5 ± 13.7	26.4 ± 18.8	20.2 ± 14.6	NS
	Fortified	22.2 ± 11.6 ^a	34.1 ± 15.9 ^b	33.5 ± 16.9 ^{b*}	<0.001
Serum transferrin (mg/dL)	Placebo	315.7 ± 54.8	335.5 ± 59.5	307.8 ± 53.1	NS
	Fortified	318.7 ± 55.8 ^a	301.9 ± 57.0 ^b	282.3 ± 45.15 ^c	<0.001
Transferrin saturation (%)	Placebo	16.1 ± 7.5	20.3 ± 13.3	18.6 ± 15.8	NS
	Fortified	16.2 ± 7.1 ^a	21.1 ± 9.5 ^{ab}	21.7 ± 7.8 ^b	0.008
25 hydroxyvitamin D (nmol/L)	Placebo	53.3 ± 14.6 ^a	42.1 ± 11.0 ^b	38.6 ± 10.4 ^b	<0.001
	Fortified	48.2 ± 13.4 ^a	39.2 ± 11.5 ^b	36.5 ± 13.1 ^b	<0.001
PTH (pg/mL)	Placebo	37.6 ± 11.0	–	35.2 ± 14.5	NS
	Fortified	38.5 ± 18.6	–	33.3 ± 5.7	NS
Alkaline phosphatase (µg/L)	Placebo	10.3 ± 3.1	10.6 ± 2.2	10.7 ± 2.8	NS
	Fortified	12.0 ± 3.6	12.0 ± 2.9	12.5 ± 3.5	NS
NTX (nmol BCE/mmol creatinine)	Placebo	82.5 ± 33.4	86.7 ± 29.4	79.9 ± 23.9	NS
	Fortified	72.8 ± 31.3	82.5 ± 29.6	78.7 ± 30.1	NS

Values are presented as means with their standard deviations (*n* = 41). Within the same row, different letters indicate significant differences (ANOVA of repeated measures followed by Bonferroni's test). Comparisons between placebo group and fortified group at each point were measured using one-sided tests (**p* < 0.05; ***p* < 0.01)

D and 25-hydroxyvitamin D levels in our volunteers could be explained since the production of vitamin D in the skin through sunlight exposure is the main contributor to vitamin D status [29]. With respect to other nutrients related to bone health, dietary intakes reached the RDA. We observed adequate intakes of calcium, magnesium,

phosphorus, vitamin C and vitamin K, which are essential nutrients to maximise bone formation and minimise bone loss [30].

Very scarce data are available on simultaneous vitamin D and iron deficiency in humans. Two observational studies in children and adolescent immigrants from Africa

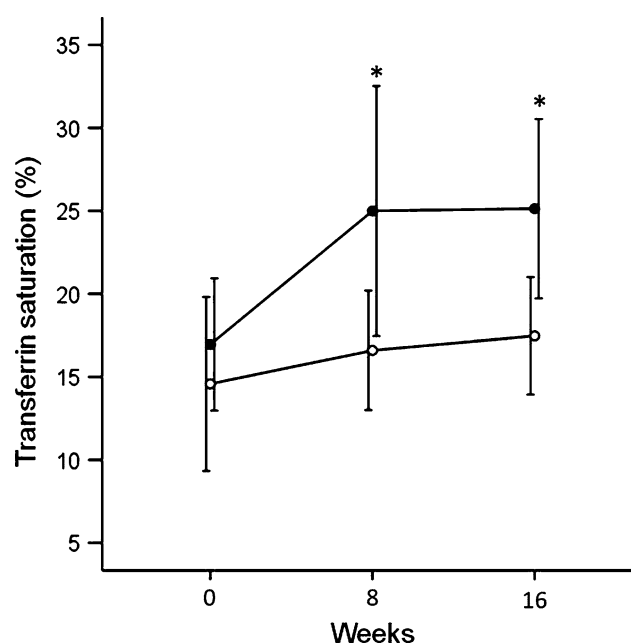


Fig. 1 Transferrin saturation at baseline, 8 and 16 weeks in volunteers that consumed the iron-fortified fruit juice depending on 25-hydroxyvitamin D levels: < 50 nmol/L (open circle) and ≥ 50 nmol/L (filled circle). Values are means with 95 % confident intervals expressed by vertical bars. Comparisons between volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L and volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L at each point were measured using one-sided tests (* $p \leq 0.05$)

and Asia to northern regions detected high prevalence of both deficiencies, which were associated with several factors such as skin pigmentation, covering clothes in females or malnutrition [3, 4]. But to the best of our knowledge, there are no data from controlled human studies in which the sample is selected as being iron deficient. Furthermore, no data are available on the possible influence of vitamin D status in iron recovery.

It is noteworthy that these young women with iron deficiency exhibited very low 25-hydroxyvitamin D levels. However, the improvement of iron status after the supplementation with the iron-fortified food did not increase 25-hydroxyvitamin D. Moreover, 25-hydroxyvitamin D levels after 16 weeks of treatment were lower than before supplementation (Table 4), most likely due to the reduction of UV light exposure produced in winter season at latitudes higher than 40° [31], since the study was performed from November to March in Madrid (Spain), and there were no differences in vitamin D intake. But, on the other hand, we found that even though the volunteers who consumed the iron-fortified fruit juice clearly improved their iron status, the recovery of transferrin saturation was lower if they had also vitamin D deficiency (Fig. 1). Therefore, the obtained results support the hypothesis that there is an association between vitamin D and iron status, although the nature of

this relationship and the underlying mechanism remains uncertain. Different studies attributed this connection to the role of iron in vitamin D activation [11, 15] and to vitamin D modulating the risk of anaemia by decreasing inflammation [5] and stimulating erythropoiesis [7]. More recent studies found a metabolic association between iron status and 25-hydroxyvitamin D levels through fibroblast growth factor 23 (FGF23) [32]. This hormone controls 1α -OHase enzyme expression, and its levels increase with low serum 25-hydroxyvitamin D [33]. One study in subjects with rickets showed that low serum iron and low haemoglobin were associated with elevated FGF23 and low 1,25-dihydroxyvitamin D [34]. However, there is a lack of evidence regarding aetiological mechanism, especially in healthy adults such as our volunteers.

Given the low levels of 25-hydroxyvitamin D found in these women, we expected the PTH levels would be higher than normal. When low 25-hydroxyvitamin D levels lead to reduced calcium levels, PTH is secreted causing an increase in bone resorption to correct hypocalcemia. This can have a negative influence on bone mass, preventing the maximum peak bone mass from being reached, which is very important in order to avoid the development of osteoporosis after menopause [35]. Nevertheless, levels of PTH and bone remodelling markers are considered to be in the normal range in these volunteers. Our research group observed that postmenopausal osteoporotic women with low 25-hydroxyvitamin D levels presented a higher decrease in bone mass than postmenopausal osteoporotic women with normal levels of 25-hydroxyvitamin D [36]. This fact has been described by other authors [37]. In a similar way, in a recent work, we found that levels of 25-hydroxyvitamin D lower than 18 ng/ml produced hyperparathyroidism (PTH > 65 pg/ml) in a high percentage of postmenopausal women [38]. However, in the present study, although approximately 50 % of the women at baseline and 75 % at the end of the study presented 25-hydroxyvitamin D < 45 nmol/L (< 18 ng/ml), their PTH levels were not higher than the upper limit of normality. In agreement, another study performed in young people living in a sunny place did not observe an increased in PTH levels associated with low 25-hydroxyvitamin D levels [39]. Some studies suggested that different factors could have an influence in the PTH and 25-hydroxyvitamin D relationship. For the same levels of 25-hydroxyvitamin D, higher age and BMI have been related to higher levels of PTH [40, 41]. Therefore, this lack of relation between low levels of 25-hydroxyvitamin D and high levels of PTH observed in our volunteers could be explained as they were young and normal-weight women.

With respect to bone turnover markers, studies that established their reference ranges for menstruating women excluded those under 30 years [42]. Given that the mean

age of the women that participated in the study was 25 years, it was difficult to classify them in a range of normality. Compared with other data of the bibliography, bone turnover markers were higher than data observed in premenopausal women with higher or similar age [43, 44]. It is known that bone turnover in women is elevated until skeletal maturity is reached, usually in the 3rd decade of life, thus the women participating in the present study were expected to have a high rate of bone remodelling, which explains the present results.

We found no relationship between iron levels and bone biomarkers, in contrast to data obtained in animal models about deleterious effects on bone in anaemic rats [11–13]. The biochemical markers of bone formation and bone resorption remained stable independently of iron status. The obtained results could be explained by the fact that our volunteers presented iron deficiency without anaemia and were young, so bone formation may prevail over bone resorption. However, it could be hypothesised that continued iron deficiency may result in substantial bone loss and higher risk of osteoporosis. In this sense, one study in postmenopausal women found that osteoporotic patients who have suffered from fragility fracture presented lower iron status than other osteoporotic women with no fractures and control women [15]. Therefore, it would be very interesting to investigate whether iron deficiency, maintained during years, could predispose to osteoporosis.

Another important issue is that the maintenance of an adequate iron and vitamin D status is essential for integral health. Iron deficiency may affect physical and cognitive performance, immunity and temperature regulation [27]. Vitamin D deficiency has been related to an increased risk of many chronic illnesses, including common cancers, autoimmune diseases, infectious diseases and cardiovascular disease [45]. These actions not only depend on renal 1 α -OHase activity, but on extra-renal 1 α -OHase mediated by vitamin D receptors distributed in many tissues [46]. Iron acts as a cofactor of all 1 α -OHases, and the activity of the extra-renal hydroxylases is regulated by the concentration of the substrate, 25-hydroxyvitamin D [47]. Therefore, low iron and 25-hydroxyvitamin D levels could lead to different health disorders derived from the low activity of body extra-renal 1 α -OHases.

The prevalence of iron deficiency in young menstruating women is highly frequent. According to our results, this situation could be accompanied by low levels of 25-hydroxyvitamin D, which can obstruct the recovery of iron status. Although bone health does not seem to be affected in this group of women, correction of iron deficiency and low 25-hydroxyvitamin D levels is an issue of great importance in the context of public health. Therefore, clinical and/or nutritional interventions should be considered in order to maintain adequate levels of vitamin D and iron.

Further studies should be carried out in anaemic and non-anaemic subjects to clarify the possible interactions between iron and vitamin D metabolism, and the possible health effects that these two deficiencies could have, taking into account also the modulating effects of diet and genetic polymorphisms. Present results add new information regarding the influence of 25-hydroxyvitamin D levels on iron status recovery but other studies should be carried out to confirm whether the improvement of 25-hydroxyvitamin D leads to better recovery of iron status in response to iron-fortified food or supplements. It is also important to study the effect of iron deficiency on bone turnover after the skeletal maturity is reached and to perform prospective studies in pre- and postmenopausal women, with and without osteoporosis. Finally, the possible effect that iron and vitamin D deficiencies can have on extra-renal 1 α -OHase functionality and their repercussions on health should be studied.

Acknowledgments The authors are grateful to I. Wright for technical support. This study was supported by Project AGL2009-11437 and Grupo Leche Pascual. R. Blanco-Rojo and L. Toxqui were supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Found.

References

- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87(4):1080S–1086S
- Bendich A (2010) Iron deficiency and overload. Humana Press, New York
- McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, Cooke R, Carapetis JR (2007) High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child* 92(12):1088–1093. doi:10.1136/adc.2006.112813
- Grindulis H, Scott PH, Belton NR, Wharton BA (1986) Combined deficiency of iron and vitamin D in Asian toddlers. *Arch Dis Child* 61(9):843–848
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA (2010) Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 89(5):447–452. doi:10.1007/s00277-009-0850-3
- Tanaka H, Teitelbaum SL (1990) Vitamin D regulates transferrin receptor expression by bone marrow macrophage precursors. *J Cell Physiol* 145(2):303–309. doi:10.1002/jcp.1041450215
- Norman AW (2006) Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147(12):5542–5548. doi:10.1210/en.2006-0946
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78(4):1193–1231
- DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80(6 Suppl):1689S–1696S
- Knott L, Bailey AJ (1998) Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22(3):181–187
- Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006) Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone

- mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(10):2547–2550
12. Parelman M, Stoecker B, Baker A, Medeiros D (2006) Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 231(4):378–386
 13. Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, Ojeda ML, Lopez-Aliaga I (2011) Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr*. doi:[10.1007/s00394-011-0212-5](https://doi.org/10.1007/s00394-011-0212-5)
 14. Ilich-Ernst JZ, McKenna AA, Badenhop NE, Clairmont AC, Andon MB, Nahhas RW, Goel P, Matkovic V (1998) Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. *Am J Clin Nutr* 68(4):880–887
 15. D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, Grimaldi A, Gennero L, Gariboldi A, Ponzetto A, Pescarmona GP, Isaia GC (2008) Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone* 43(6):1010–1015. doi:[10.1016/j.bone.2008.08.107](https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.107)
 16. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcaino C, Delgado MA, Vaquero MP (2011) Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr* 105(11):1652–1659. doi:[10.1017/S0007114510005490](https://doi.org/10.1017/S0007114510005490)
 17. Institute of Medicine (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Food and Nutrition Board, Washington DC
 18. de Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG (1996) Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA study. *Eur J Clin Nutr* 50(Suppl 2):S123–S124
 19. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP (2009) An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr* 102(4):546–553. doi:[10.1017/S0007114509220794](https://doi.org/10.1017/S0007114509220794)
 20. DIAL (2010) Alce Ingeniería, Spain
 21. Rodriguez Sangrador M, Beltran de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O (2010) Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project)]. *Nutr Hosp* 25(5):755–762
 22. Groba MV, Miravalle A, Gonzalez Rodriguez E, García Santana S, Gonzalez Padilla E, Saavedra P, Soria A, Sosa M (2010) Factors related to vitamin D deficiency in medical students in Gran Canaria. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2:11–18
 23. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2011) Tablas de composición de alimentos. 15 ampliada y revisada edn
 24. Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, Lorenzo H, Polanco I, Quiles J, Romero de Avila MD, Russolillo G, Villarino A, Alfredo Martinez J (2009) Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp* 24(4):384–414
 25. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP (2009) Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem* 65(2):165–174
 26. Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, Buil A, Arroyo-Pardo E, Soria JM, Vaquero MP (2011) Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr Metab (Lond)* 8:69. doi:[10.1186/1743-7075-8-69](https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-69)
 27. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP (2010) Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 25(3):350–365
 28. Roman Vinas B, Ribas Barba L, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, de Groot LC, Van't Veer P, Matthys C, Serra Majem L (2011) Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Ann Nutr Metab* 59(2–4):84–95. doi:[10.1159/000332762](https://doi.org/10.1159/000332762)
 29. Lips P (2010) Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121(1–2):297–300. doi:[10.1016/j.jsbmb.2010.02.021](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.021)
 30. Mesias M, Seiquer I, Navarro MP (2011) Calcium nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(3):195–209. doi:[10.1080/10408390903502872](https://doi.org/10.1080/10408390903502872)
 31. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3):266–281. doi:[10.1056/NEJMr070553](https://doi.org/10.1056/NEJMr070553)
 32. Durham BH, Joseph F, Bailey LM, Fraser WD (2007) The association of circulating ferritin with serum concentrations of fibroblast growth factor-23 measured by three commercial assays. *Ann Clin Biochem* 44(Pt 5):463–466. doi:[10.1258/000456307781646102](https://doi.org/10.1258/000456307781646102)
 33. Prie D, Friedlander G (2010) Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. *Clin J Am Soc Nephrol* 5(9):1717–1722. doi:[10.2215/CJN.02680310](https://doi.org/10.2215/CJN.02680310)
 34. Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ (2011) Iron modifies plasma FGF23 differently in autosomal dominant hypophosphatemic rickets and healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96(11):3541–3549. doi:[10.1210/jc.2011-1239](https://doi.org/10.1210/jc.2011-1239)
 35. Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22(4):477–501
 36. Alcoba LM, Cabeza B, Castaño-Milla C, Castaño de la Mota MJ, Matías MJ, Sanchez-Pernaute O, de la Piedra C (2006) Patrón clínico y bioquímico de los pacientes con elevación de la hormona paratiroidea (PTH) en una cohorte de 103 casos de osteoporosis. *Revista española de enfermedades metabólicas óseas* 15:115
 37. Hollis BW (2005) Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135(2):317–322
 38. Ahijado P, Rubert M, Zazo P, Mahillo I, de la Piedra C (2010) Hiperparatiroidismo secundario asociado a un déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2:16
 39. Gonzalez-Padilla E, Soria Lopez A, Gonzalez-Rodriguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco Mdel V, Saavedra P, Quesada Gomez JM, Sosa Henriquez M (2011) High prevalence of hypovitaminosis D in medical students in Gran Canaria, Canary Islands (Spain). *Endocrinol Nutr* 58(6):267–273. doi:[10.1016/j.endonu.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.03.002)
 40. Maetani M, Maskarinec G, Franke AA, Cooney RV (2009) Association of leptin, 25-hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in women. *Nutr Cancer* 61(2):225–231. doi:[10.1080/01635580802455149](https://doi.org/10.1080/01635580802455149)
 41. Gonzalez-Molero I, Morcillo S, Valdes S, Perez-Valero V, Botas P, Delgado E, Hernandez D, Oliveira G, Rojo G, Gutierrez-Repiso C, Rubio-Martin E, Menendez E, Soriguer F (2011) Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 65(3):321–328. doi:[10.1038/ejcn.2010.265](https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.265)
 42. Glover SJ, Garner P, Naylor K, Rogers A, Eastell R (2008) Establishing a reference range for bone turnover markers in

- young, healthy women. *Bone* 42(4):623–630. doi:[10.1016/j.bone.2007.12.218](https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.218)
43. Ardawi MS, Maimani AA, Bahksh TA, Rouzi AA, Qari MH, Raddadi RM (2010) Reference intervals of biochemical bone turnover markers for Saudi Arabian women: a cross-sectional study. *Bone* 47(4):804–814. doi:[10.1016/j.bone.2010.07.017](https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.017)
44. Del Campo MT, Gonzalez-Casaus ML, Aguado P, Bernad M, Carrera F, Martinez ME (1999) Effects of age, menopause and osteoporosis on free, peptide-bound and total pyridinium cross-link excretion. *Osteoporos Int* 9(5):449–454
45. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J (2010) The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 25(9):2850–2865. doi:[10.1093/ndt/gfq313](https://doi.org/10.1093/ndt/gfq313)
46. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS (2007) Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3–5):316–321. doi:[10.1016/j.jsbmb.2006.12.078](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.078)
47. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zugel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311(5768):1770–1773. doi:[10.1126/science.1123933](https://doi.org/10.1126/science.1123933)